



Cláudia Vanessa Soares Prego

Licenciada em Biologia

**Efeito da modulação da actividade do
corpo carotídeo na obesidade: diminuição
do ganho de peso e da massa gorda
corporal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Sílvia Vilares Conde, PhD, CEDOC
Professora auxiliar Farmacologia, Faculdade de Ciências
Médicas, Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Efeito da modulação da actividade do corpo carotídeo na obesidade: diminuição do ganho de peso e da massa gorda corporal

Copyright Cláudia Vanessa Soares Prego, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Era uma vez... “Os sete anões de Farmacologia sem a Branca de Neve”

Em primeiro lugar, começo por agradecer à Prof^a Doutora **Sílvia Conde** (“Mestre”) pela oportunidade que me proporcionou. Esta oportunidade fez-me não só enriquecer a minha formação como também crescer como pessoa.

“Pedras no caminho? Guardo-as todas, um dia construirei um castelo.”

Fernando Pessoa

Dito isto, quero agradecer a todas as pessoas que fizeram com que as pedras que surgiram no caminho não parecessem tão pesadas de transportar...

Joana (“Soneca”) e **Bernardete** (“Atchim”), que há a dizer? Penso que estas linhas serão insuficientes para expressar todo o meu agradecimento. De uma forma reduzida: Obrigada pela passagem de conhecimentos, pelos “sermões”, pelas gargalhadas e brincadeiras. Obrigada por respeitarem o meu espaço naqueles dias em que sabiam que era melhor não mexer comigo, por ouvirem os meus desabaços e por tentarem aliviar o fardo que muitas vezes eu própria me colocava.

Marlene (“Feliz”) e **Miguel** (“Dengoso”), companheiros de jornada... Percurso difícil não? Porém, penso que os 3 juntos, com altos e baixos, com apoio e compreensão conseguimos levar tudo a bom porto e deixar uma “pegada” neste grupo que tão bem nos acolheu.

Eliano (“Dunga”), o senhor Doutor... Obrigada pelas conversas.

Visto que estamos a falar de histórias... Todas as pessoas que passam na nossa vida deixam uma “marca” e acrescentam algo ao nosso livro que é a vida!

Carolina e **Rita**, não existem palavras para descrever o que sinto por vocês. Há coisas que não se podem dizer, apenas sentir. Obrigada por todas as conversas, conselhos, gargalhadas, mimos e preocupações. Um viva às amigas que não são de sempre, mas sim para sempre.

Joana, Tiago, Filipe, mais elementos que fazem parte do “encontro da comitiva” e me aturaram ao longo de dois anos... não mudem nunca.

Posso garantir que tudo isto já valeu a pena só pelo facto de vos ter conhecido!

Como não poderia deixar de ser... o próximo agradecimento é destinado à base do ser humano, a família...

Pai, mãe, mana... Forma tão subtil de agradecer. Não são estas linhas que conseguirão traduzir o quanto vos estou grata. Não que não seja importante, mas não quero agradecer pelo investimento financeiro que tiveram comigo. Quero agradecer sim, pelas “conversas”, que às vezes eram autênticos monólogos, onde só eu falava. Obrigada por todas as vezes que disseram e demonstraram que tinham orgulho e que acreditavam em mim, quando eu própria duvidava.

Tia Lúcia, minha 2^a mãe... Nem a distância fez com que estivesse menos presente na minha vida. Obrigada por estares sempre lá, perto ou longe. Por me conheceres melhor que ninguém. Por me mostrares o lado bom da vida. Toda a gente tem um herói... Sem dúvida és a minha heroína, sem capa voadora, mas com super-poderes que tu própria desconheces.

Tia Carla, tia do “Secão”... Obrigada por seres a tia maluca, que me consegue dar um choque de realidade e no segundo seguinte fazer-me sonhar e acreditar que é possível.

Obrigada por todos me moldarem e, de certa forma, me tornarem naquilo que sou hoje.

Por último, mas não menos importante... Obrigada **Válter**. Apesar das minhas escolhas que sempre nos afastaram, queria agradecer por estares sempre lá para mim, por seres o meu maior amigo e confidente. Obrigada por amparares as minhas quedas e aplaudires de pé as minhas conquistas. Agora vejo que, muitas vezes, foste o meu saco de boxe e o meu trampolim quando eu batia no fundo.

Resumindo: Todos vocês fizeram com que os alicerces do castelo já estejam montados... Garanto que quando o castelo estiver pronto, não me esquecerei de vos convidar para a festa.

“Obrigada”, a palavra mais usada nestas linhas, torna-se uma palavra tão pequena neste momento!

Com o maior carinho do mundo,
Cláudia (“Zangado”)

Abstract

The prevalence of obesity has been increasing at an alarming rate. Approximately 3 million people, per year, die from overweight associated causes, being this pathology already called the "21st Century World Epidemic". Considering these worrisome data, it is clear that the existing therapies are scarce to address this problem.

Recently, a new function for the carotid body (CB), a chemoreceptor organ classically defined as an oxygen sensor, in glucose homeostasis has been proposed. It was demonstrated that in animal models of metabolic disorders have an increased activity of the organ and that the abolition of CB activity through bilateral carotid sinus nerve (CSN) resection prevents and reverses insulin resistance and glucose intolerance.

Taking this into account, the main objective of this work was to study the modulation of CB activity as a possible therapeutic target for obesity.

To achieve our goal, *Wistar* rats were randomly divided into two groups and submitted to 10 weeks of hypercaloric (5.1Kcal/g) or control (2.56Kcal/g) diets. After 10 weeks of diet, the animals were submitted to either bilateral CSN ablation or to a Sham surgery. The resection of the CSN was confirmed by the absence of ventilatory responses to hypoxia. After surgery, animals were kept on their respective diets for 9 weeks at the end of which they were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and tissues collected, weighed and stored for further analysis. Insulin sensitivity, glucose tolerance, caloric intake and body weight were monitored before and after surgeries.

In this work, it was observed that the modulation of CB activity through bilateral CSN resection decreases weight gain and body fat mass in rodents submitted to an hypercaloric diet. In addition, it was also possible to observe a lower lipid deposition in the liver in the HF animals submitted to CSN resection. Furthermore, it was possible to observe a recover of insulin sensitivity and an improvement in glucose tolerance, as well as an improvement in serum insulin and C-peptide concentrations and plasma NO concentration.

To conclude, this study demonstrates that the suppression of CB activity could be a valuable tool in possible future therapeutic intervention for obesity.

Key words: Obesity, Adipose tissue, Hypercaloric diet, Carotid body, Carotid sinus nerve resection

Resumo

A prevalência da obesidade tem aumentado de uma forma alarmante. Por ano, cerca de 3 milhões de pessoas morrem por causas associadas ao sobrepeso estando esta patologia já apelidada de “Epidemia Mundial do século XXI”. Tendo em conta estes dados preocupantes, fica claro que as terapêuticas existentes são escassas para fazer face a esta problemática.

O corpo carotídeo (CB) é um órgão quimiorreceptor classicamente definido como um sensor de oxigénio. Recentemente, foi descrito que o CB também estaria envolvido na homeostasia da glucose. Foi demonstrado em modelos animais com patologias metabólicas, que a actividade deste órgão se encontra aumentada e que a abolição da actividade do CB, através da ablação bilateral do nervo do seio carotídeo (CSN), previne e reverte a resistência à insulina e a intolerância à glucose.

Tendo em conta estes factos, o objectivo principal deste trabalho consistiu no estudo da modulação da actividade do CB como um possível alvo terapêutico para a obesidade.

Para tal, ratas *Wistar* foram divididas aleatoriamente em dois grupos sendo os animais submetidos a 10 semanas de dietas hipercalórica (5,1Kcal/g) ou controlo (2,56 Kcal/g). Posteriormente, foram realizadas cirurgias em que ocorreu ablação bilateral do CSN e cirurgias *Sham*. A ressecção do CSN foi confirmada pela ausência de respostas ventilatórias à hipóxia. Após a cirurgia, os animais foram mantidos nas respectivas dietas durante 9 semanas e a sensibilidade à insulina, a tolerância à glucose, a ingestão calórica e o peso corporal foram monitorizados. Nas experiências terminais, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60mg/Kg i.p.) e os tecidos foram recolhidos, pesados e guardados para análises à posteriori.

Neste trabalho observou-se que a modulação da actividade do CB através da ablação bilateral do CSN produz uma diminuição de ganho de peso e da massa gorda corporal em roedores sujeitos a dieta hipercalórica. Para além disso, também foi possível observar uma menor deposição de lípidos no fígado nos HF com corte do CSN. E ainda, pode-se observar um restauro na sensibilidade à insulina e melhoria na tolerância à glucose, bem como uma melhoria nas concentrações séricas de insulina e péptido C e na concentração de NO plasmático.

Em conclusão, este estudo demonstra que a supressão da atividade do CB poderá ser utilizada como uma possível intervenção terapêutica para a obesidade.

Termos Chave: Obesidade, Tecido adiposo, Dieta hipercalórica, Corpo carotídeo, Ablação do nervo do seio carotídeo

1. INTRODUÇÃO	- 1 -
1.1. Síndrome metabólico	- 1 -
1.2. Obesidade e comorbilidades	- 2 -
1.2.1. Epidemiologia da obesidade	- 4 -
1.3. Características e funções do tecido adiposo	- 5 -
1.3.1. Tipos de tecidos adiposos: Branco, Castanho e Bege – diferenças morfológicas e funcionais	- 6 -
1.3.1.1. Tecido adiposo branco	- 6 -
1.3.1.2. Tecido adiposo castanho	- 8 -
1.3.1.3. Tecido adiposo bege	- 8 -
1.4. Acção da insulina no tecido adiposo e a sua função na homeostasia da glucose	- 9 -
1.4.1. Acção da insulina no tecido adiposo	- 9 -
1.4.2. Metabolismo da glucose	- 10 -
1.4.3. Transporte de glucose nos tecidos e via de sinalização associada ao receptor de insulina	- 12 -
1.5. Corpo Carotídeo: um quimiorreceptor periférico	- 15 -
1.5.1. Papel do corpo carotídeo na homeostasia energética	- 16 -
2. OBJECTIVOS	- 19 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS	- 21 -
3.1. Modelo animal e procedimento experimental	- 21 -
3.2. Teste Metabólicos	- 23 -
3.2.1. Testes de tolerância à insulina	- 23 -
3.2.2. Testes de tolerância oral à glucose	- 24 -
3.2.3. Avaliação do balanço energético: quantificação da diurese e das fezes	- 24 -
3.3. Pletismografias	- 25 -
3.4. Medição da pressão arterial média	- 25 -
3.5. Conteúdo total de lípidos no fígado	- 26 -
3.6. Quantificação de biomarcadores no soro e/ou plasma	- 27 -
3.7. Análise Estatística	- 27 -
4. RESULTADOS	- 29 -
4.1. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo no ganho de peso, na massa gorda corporal e nos parâmetros lipídicos	- 29 -
4.1.1. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica do CSN no ganho de peso	- 29 -
4.1.2. Efeito da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na ingestão calórica	- 30 -

4.1.3.	Efeito da dieta rica em lípidos e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na massa gorda corporal	- 31 -
4.1.4.	Efeitos da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN no BAT	- 32 -
4.1.5.	Efeitos da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN nos depósitos de lípidos no fígado	- 33 -
4.2.	Efeito da dieta rica em lípidos e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo nos parâmetros metabólicos	- 34 -
4.2.1.	Efeito da dieta rica em lípidos e do corte bilateral do CSN na glicémia em jejum e na sensibilidade à insulina.....	- 34 -
4.2.2.	Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN na tolerância oral à glucose.....	- 35 -
4.2.3.	Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN nos níveis de insulina e péptido C.....	- 38 -
4.2.4.	Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na diurese e na quantidade de fezes.....	- 40 -
4.3.	Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na ventilação basal e respostas à hipóxia e hiperapnia	- 42 -
4.3.1.	Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN na ventilação basal ...	- 42 -
4.3.2.	Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN nas respostas ventilatórias à hipóxia e à hiperapnia	- 43 -
4.4.	Efeito da dieta rica em lípidos e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo nos parâmetros hemodinâmicos	- 45 -
5.	DISCUSSÃO	- 47 -
6.	CONCLUSÃO	- 55 -
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	- 57 -
8.	REFERÊNCIAS.....	- 59 -

Índice de Figuras

Figura 1.1: Mapa da distribuição mundial da obesidade (indivíduos com mais de 18 anos), 2014. ...	- 5 -
Figura 1.2: Composição do tecido adiposo.	- 5 -
Figura 1.3: Esquema das diferenças morfológicas e funcionais dos três tipos de adipócitos (brancos, castanhos e beges).	- 6 -
Figura 1.4: Alterações induzidas pela obesidade na secreção de adipocinas e no desenvolvimento da resistência à insulina.	- 7 -
Figura 1.5: Modo de activação de BAT e consequências da sua actividade termogénica.	- 9 -
Figura 1.6: Valores de referência de glicémias.	- 10 -
Figura 1.7: Representação esquemática da utilização da glucose corporal.	- 11 -
Figura 1.8: Esquema representativo do metabolismo da glucose.	- 12 -
Figura 1.9: Esquema representativo do transporte de glucose para os tecidos (transporte mediado pela insulina).	- 14 -
Figura 1.10: Via de transdução de sinal da insulina.	- 14 -
Figura 1.11: Representação esquemática da localização e constituição do Corpo Carotídeo. ...	- 15 -
Figura 3.1: Esquema representativo do procedimento cirúrgico correspondente ao corte do CSN.	- 21 -
Figura 3.2: Esquema representativo do protocolo experimental realizado em ratas <i>Wistar</i>	- 22 -
Figura 3.3: Curva representativa da diminuição da glucose no teste de tolerância à insulina em ratas.	- 23 -
Figura 3.4: Curva representativa das glicémias dos animais controlo obtidas ao longo dos testes de tolerância à glucose oral.	- 24 -
Figura 3.5: Protocolo experimental de pletismografia em animais conscientes e em livre movimento.	- 25 -
Figura 3.6: Esquema representativo do protocolo adoptado para avaliar o conteúdo total de lípidos no fígado.	- 26 -
Figura 4.1: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN no ganho de peso dos animais.	- 29 -
Figura 4.2: Efeito da desnervação bilateral do CSN na ingestão calórica dos animais.	- 30 -
Figura 4.3: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica bilateral do CSN na quantidade de gordura.	- 32 -
Figura 4.4: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação crónica bilateral do CSN na quantidade de BAT.	- 33 -
Figura 4.5: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica bilateral do CSN nos depósitos de lípidos no fígado.	- 33 -
Figura 4.6: Efeito do corte bilateral do nervo do seio carotídeo (CSN) nas glicémias em jejum e na sensibilidade à insulina em grupos submetidos a dieta controlo (CTL) e dieta hipercalórica (HF) ...	- 35 -
Figura 4.7: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN na tolerância à glucose, representada através das curvas de excursão da glucose obtidas a partir dos teste de tolerância oral à glucose realização dos OGTTs.	- 36 -

Figura 4.8: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN na tolerância à glucose, representada como área sobre a curva das curvas de excursão de glucose determinada através de testes de tolerância oral à glucose (OGTTs).....	- 37 -
Figura 4.9: Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN nos níveis de insulina e péptido C do soro	- 39 -
Figura 4.10: Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na diurese e na quantidade de fezes	- 40,41 -
Figura 4.11: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN na ventilação basal, medida como volume minuto.....	- 42 -
Figura 4.12: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação bilateral do CSN nas respostas ventilatórias à hipóxia e à hipercapnia.....	- 43 -
Figura 4.13: Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na pressão arterial sistólica, diastólica e média.....	- 45 -
Figura 4.14: Efeito da dieta hiperlipídica e da ressecção bilateral do CSN na concentração de NO plasmática.....	- 46 -

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Factores indicativos de síndrome metabólico.....	- 1 -
Tabela 1.2: Classificação do estado de sobrenutrição.	- 3 -
Tabela 1.3: Terapêuticas anti-obesidade aprovadas pela <i>Food and Drug Administration (FDA)</i> e pela <i>European Medicine Agency (EMA)</i>	- 4 -

Lista de Abreviaturas

ATP: Adenosina trifosfato
ANOVA: *analysis of variance*
AUC: Área sob a curva
BAT: Tecido adiposo castanho
BP: *Blood pressure*, Pressão arterial
CB: Corpo Carotídeo
CO₂: Dióxido de carbono
CSN: Nervo do seio carotídeo
CTL: Dieta controlo
DBP: *Diastolic blood pressure*, Pressão arterial diastólica
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
F: frequência respiratória
F1: Fase 1
F2: Fase 2
FFA: Ácidos gordos livres
FGF 21: Factor de crescimento de fibroblastos 21
GABA: ácido γ-aminobutírico
GLP-1: péptido similar ao glucagon tipo 1
GLP-2: péptido similar ao glucagon tipo 2
GLUT: Proteínas transportadoras de glucose
HDL: Lipoproteína de densidade elevada
HF: *High fat*, Dieta hipercalórica
HSu: dieta níveis de sacarose elevados
IL-6: Interleucina 6
IMC: Índice de massa corporal
i.p.: Intraperitoneal
IRS: substratos para o receptor de insulina
ITT: Testes de tolerância à insulina
IVGTT: Testes de tolerância à glucose intravenosa
KITT: Constante do teste de tolerância à insulina
MBP: *Mean blood pressure*, Pressão arterial média
N2: Azoto
MAPK: proteína cinase activada pelo mitogénio
MV: Volume por minuto
NaCl: Cloreto de sódio
NO: Óxido nítrico
O₂: Oxigénio
OGTT: Teste de tolerância à glucose oral

PI3K: fosfatidilinositol-3 cinase

PKB/AKT: proteína cinase B

RPM: Rotações por minuto

SBP: *Systolic blood pressure*, Pressão arterial sistólica

SHC: *Src-homology-2-containing protein*

SM: Síndrome Metabólico

SNS: Sistema nervoso simpático

TNF- α : Factor de necrose tumoral alfa

UCP1: Proteína de desacoplamento 1

VT: Volume tidal

WAT: Tecido adiposo branco

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome metabólica

O síndrome metabólico (SM) é definido por um conjunto de factores fisiológicos, bioquímicos e metabólicos que aumentam directamente o risco de doenças coronárias cardíacas e/ou outro tipo de doenças cardiovasculares, bem como de diabetes tipo 2 e obesidade (Grundy et al., 2004; Wilson et al., 2005).

Tem como principais características a dislipidemia aterogénica, diminuição da tolerância à glucose, hipertensão, inflamação, obesidade abdominal e resistência à insulina, sendo estas duas últimas características, consideradas manifestações centrais deste síndrome (Grundy et al., 2005).

A prevalência do SM encontra-se em ascensão, no entanto, é difícil de definir o número exacto da população afectada por esta problemática, uma vez que depende da população estudada, da região e sobretudo da definição de síndrome metabólico considerada (Desroches & Lamarche 2007).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (2006), os critérios para diagnosticar o SM encontram-se sumariados na tabela abaixo (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Factores indicativos de síndrome metabólico. Classificação feita pela Federação Internacional de Diabetes (2006).

Aumento de Triglicérideos	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l) - características específicas destes lípidos anormais
Redução Colesterol HDL	< 40 mg/dl (1,03 mmol/l) em homens; < 50 mg/dl (1,29 mmol/l) em mulheres; - características específicas anormais
Aumento Pressão Sanguínea	- Pressão sanguínea sistólica ≥ 130 mmHg ou - Pressão sanguínea diastólica ≥ 85 mmHg - Hipertensão
Aumento dos níveis plasmáticos de glucose em jejum	≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l), ou previamente diagnosticado diabetes tipo 2 - Se OGTT ≥ 5,6 mmol/l ou 100 mg/dl, forte indicação, mas não define necessariamente a presença de síndrome
Obesidade Central (circunferência da cintura)	>94cm em homens >80cm em mulheres

*HDL: lipoproteína de densidade elevada; OGTT: Teste de tolerância à glucose oral

Em situações normais, a insulina é segregada pelas células β do pâncreas estimulando a captação da glucose para o interior dos tecidos com uma consequente diminuição da glucose plasmática, e estimulando a síntese de glicogénio e de lípidos.

Quando existe uma desregulação do peso corporal, culminando em obesidade, o excesso de energia é armazenado na forma de triglicerídeos desencadeando uma hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo, que resultará numa alteração do metabolismo dos ácidos gordos e libertação de adipocinas. Ambas as alterações levarão ao desenvolvimento de SM.

A certa altura, o tecido adiposo deixa de conseguir acumular a gordura. Esta é, então, acumulada noutros tecidos, nomeadamente no fígado e no músculo, favorecendo a resistência à insulina (Nelson e Cox, 2013).

Para além dos problemas de saúde pública, o SM também representa um problema económico devido ao custo elevado do tratamento destas condições patológicas. A resposta a esta problemática continua inadequada quer do ponto de vista da prevenção quer do tratamento, sendo necessária uma estratégia de investigação a fim de diminuir o impacto nos cuidados de saúde e na economia.

1.2. Obesidade e comorbilidades

A obesidade é uma doença metabólica crónica, caracterizada por uma acumulação anormal ou excessiva de gordura (Nascimento et al., 2008), surgindo devido a um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (Goossens, 2008). Segundo vários estudos, esta patologia tem uma contribuição bastante vincada no desenvolvimento de dislipoproteinemia, diabetes tipo 2 – resistência à insulina –, hipertensão e doenças cardiovasculares (Zafirir 2013; Oliveira et al. 2010), uma vez que uma dieta hipercalórica promove o aumento de peso e gordura corporal, da pressão arterial sistólica e o aumento dos níveis de glucose, triglicerídeos, insulina e leptina no plasma (Nascimento et al., 2008).

Esta perturbação metabólica é consequência da interação entre uma predisposição genética com factores ambientais, nomeadamente maus hábitos alimentares e sedentarismo, sendo por estes motivos considerada uma doença multifactorial complexa (Oliveira et al., 2010).

A manutenção da homeostasia energética (balanço entre o aporte e o gasto de energia) deve-se à existência de sinais a curto e longo prazo (originados no tracto gastrointestinal e que actuam no cérebro), sendo que os primeiros são activados aquando da ingestão de alimentos e os mais tardios informam sobre o estado energético global do organismo e determinados aspectos metabólicos. Os péptidos gastrointestinais (colecistoquina, somatostatina, enterostatina, amilina, bombesina, péptidos similares ao glucagon tipo 1 e 2 (GLP-1 e GLP-2), apolipoproteína A-IV, péptido inibidor gástrico e grelina) são os responsáveis pela regulação da ingestão de alimentos (sinais a curto prazo), sendo os principais intervenientes na supressão de apetite, com a excepção da grelina que aumenta o apetite. A longo prazo, a manutenção do equilíbrio energético é assegurada pela acção da leptina segregada pelo tecido adiposo, da insulina segregada pelas células β pancreáticas assim como pela acção de outras adipocinas. A leptina é conhecida como a hormona da saciedade, dando “informação” sobre as

gorduras acumuladas no tecido adiposo sob a forma de triglicerídeos. Quanto maior a quantidade de gordura existente no organismo, mais leptina é secretada (Friedman e Halaas, 1998).

A descoberta da leptina em 1994 (Zhang et al., 1994) criou expectativas relativamente a uma possível terapêutica para a obesidade. Num estudo realizado em 1995 (Halaas et al., 1995), administrava-se leptina exógena em ratos obesos que careciam de leptina sérica. Posteriormente verificou-se, que entre outros benefícios, ocorria uma redução na ingestão de alimento que se traduzia numa perda de peso dos animais referidos. No entanto, ao medir as concentrações plasmáticas de leptina em humanos, observou-se que existia uma estreita correlação entre o Índice de Massa Corporal (IMC) e a concentração de leptina plasmática (Considine et al., 1996). Isto levou a crer que em humanos obesos existe uma resistência à leptina por carência ou *down regulation* dos receptores funcionais desta hormona (Chua et al., 1996).

Está demonstrado que as dietas ricas em gorduras podem atenuar o efeito central da leptina e da insulina aquando a ingestão de alimentos, e consequentemente a homeostasia energética devido a uma alteração entre o tecido adiposo e o sistema nervoso (Figlewicz e Benoit, 2009).

Poderá, talvez, dizer-se que a indústria alimentar tem responsabilidade no que toca à problemática da obesidade devido ao aumento da produção de alimentos onde predominam os açúcares refinados e as gorduras que fornecem uma alta densidade energética, com uma elevada quantidade de calorias, mas com uma reduzida proporção de nutrientes. As dietas ricas em alimentos com um alto índice glicémico provocam um aumento da glucose e insulina em circulação, culminando numa diminuição da oxidação das gorduras. Uma vez que estas não são oxidadas, são armazenadas no organismo.

A Associação Portuguesa de Nutricionistas classifica o estado de sobrenutrição em três graus: Obesidade grau I, Obesidade grau II e Obesidade Mórbida, dependendo do IMC (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Classificação do estado de sobrenutrição. Encontra-se de acordo com a Associação Portuguesa de Nutricionistas (2017).

Classificação	IMC (Kg/m ²)
Peso baixo	≤18,5
Peso normal	18,5 a 24,9
Pré- obesidade	25 a 29,9
Obesidade grau I	30 a 34,9
Obesidade grau II	35 a 39,9
Obesidade Mórbida	≥ 40

A cirurgia é o tratamento que produz eficácia clínica em termos de perda e manutenção de peso em indivíduos com obesidade mórbida com comorbilidades associadas. Contudo, trata-se de uma estratégia com custos elevados e com risco de complicações, sendo inadequada como solução para o

número de indivíduos afectados por esta doença. A intervenção farmacológica poderia ser mais adequada para pacientes diagnosticados com obesidade de grau I, mas com outras complicações de saúde associadas. Os fármacos hoje em dia utilizados para o tratamento da obesidade possuem diferentes alvos terapêuticos e mecanismos de acção, contudo têm uma eficácia limitada resultando numa reduzida perda de peso e tendo ainda efeitos adversos associados (Tabela 1.3) (Diabetes Care 2016).

Tabela 1.3: Terapêuticas anti-obesidade aprovadas pela *Food and Drug Administration (FDA)* e pela *European Medicine Agency (EMA)*. Adaptado de (Kusminski et al., 2016).

Fármaco	Mecanismo de Acção	Peso perdido (%)
<i>Orlistat</i>	Inibidor da lipase gástrica e pancreática	5 - 11
<i>Lorcaserin</i>	Agonista da Serotonina	3 - 5
<i>Phentermine + Topiramate</i>	Modulação do receptor do GABA + agente libertador da noradrenalina	9 - 11
<i>Naltrexone + Bupropion</i>	Reuptake do inibidor da dopamina + noradrenalina + antagonista opioide	< 5
<i>Liraglutide</i>	Agonista do receptor GLP -1	5 - 12
<i>Metformin</i>	Mecanismo de acção desconhecido ¹	< 5

*GABA: ácido γ-aminobutírico;

¹Mecanismo de acção desconhecido. Contudo, sabe-se que este fármaco, para além da diminuição de peso, melhora a sensibilidade à insulina, reduz o colesterol e triglicéridos, melhora a hipofibrinólise nos obesos e diabéticos, por exemplo (Rena et al., 2017).

1.2.1. Epidemiologia da obesidade

A prevalência da obesidade tem aumentado de uma forma alarmante, tendo duplicado na última década na Europa Ocidental. Por ano, cerca de 3 milhões de pessoas morrem por causas associadas ao sobrepeso (Stetka, 2015) estando esta patologia já apelidada de “Epidemia Mundial do século XXI”, sendo considerada o maior problema de saúde pública (James, 2004; Zafrir, 2013) (Figura 1.1).

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística, em 2014, cerca de 16,4% da população residente em Portugal com idade igual ou superior a 18 anos, apresenta um IMC, correspondente ao estado de obesidade, isto é, igual ou superior a 30kg/m².

Tendo em conta os números supracitados, e a resposta farmacológica pouco eficaz existente até ao momento (Tabela 1.3), é urgente a realização de mais estudos para que se possa fazer face a esta realidade.

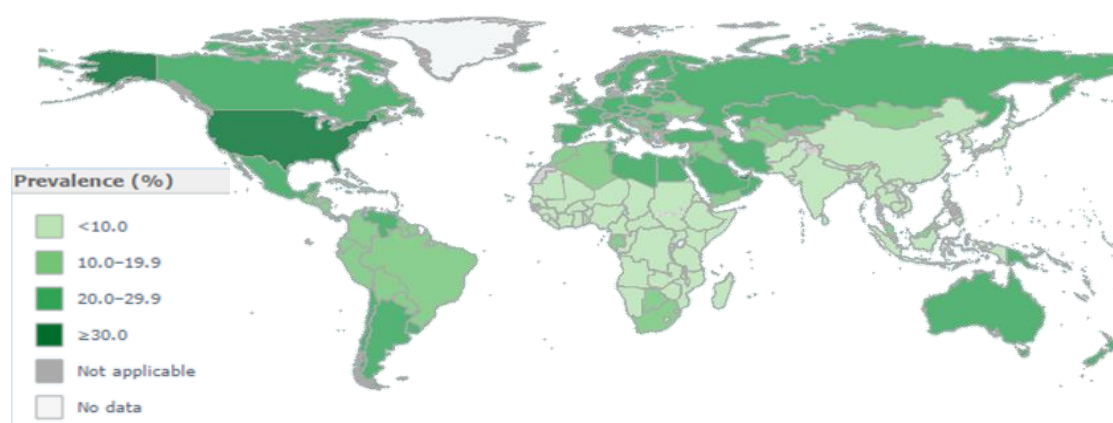


Figura 1.1: Mapa da distribuição mundial da obesidade (indivíduos com mais de 18 anos), 2014. Obtido através da Organização Mundial de Saúde.

1.3. Características e funções do tecido adiposo

O tecido adiposo desenvolve-se maioritariamente durante o período perinatal, mas o número de adipócitos pode aumentar de acordo com a alimentação e ingestão de calorias durante a vida.

É constituído pela matriz de tecido conjuntivo (fibras de colagénio e reticulares), fibras nervosas, estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos, pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) e adipócitos (Figura 1.2).

Na obesidade, ocorrem alterações morfológicas e/ou funcionais acentuadas no tecido adiposo, o que originam a sua desregulação.

Classicamente, o tecido adiposo pode ser subdividido em tecido adiposo branco (visceral, renal, genital e subcutâneo) e tecido adiposo castanho. Ambos têm em comum a capacidade de acumulação de lípidos intracelularmente sobre a forma de gotículas (Zafrir, 2013). Recentemente, foi descrito ainda mais um tipo de tecido adiposo, denominado de bege (Betz e Enerbäck, 2015; Sidossis e Kajimura, 2015).

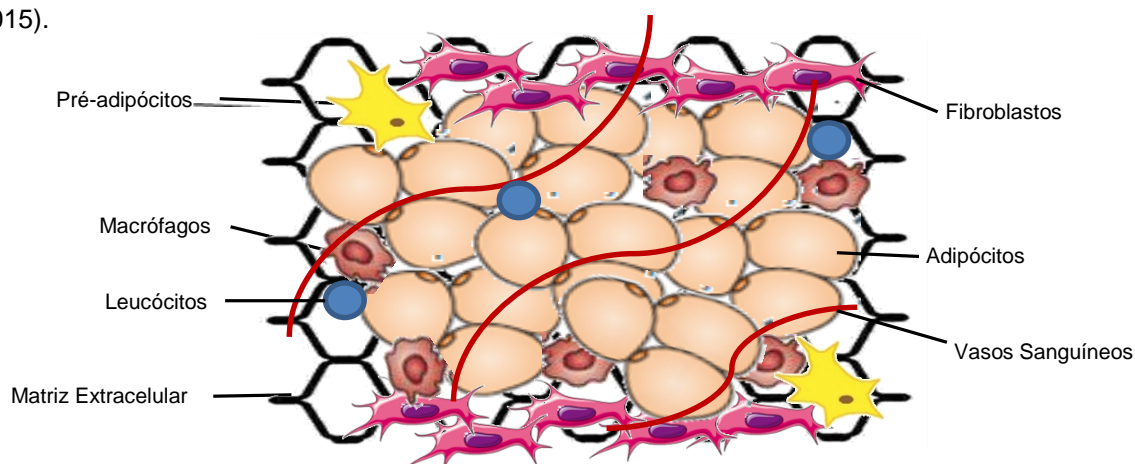


Figura 1. 2: Composição do tecido adiposo. Este é composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células vasculares e vasos sanguíneos, células imunes e matriz extracelular.

1.3.1. Tipos de tecidos adiposos: Branco, Castanho e Bege – diferenças morfológicas e funcionais

Devido a diferenças morfológicas e funcionais, o tecido adiposo pode ser classificado em: tecido adiposo branco, castanho ou bege (Figura 1.3).

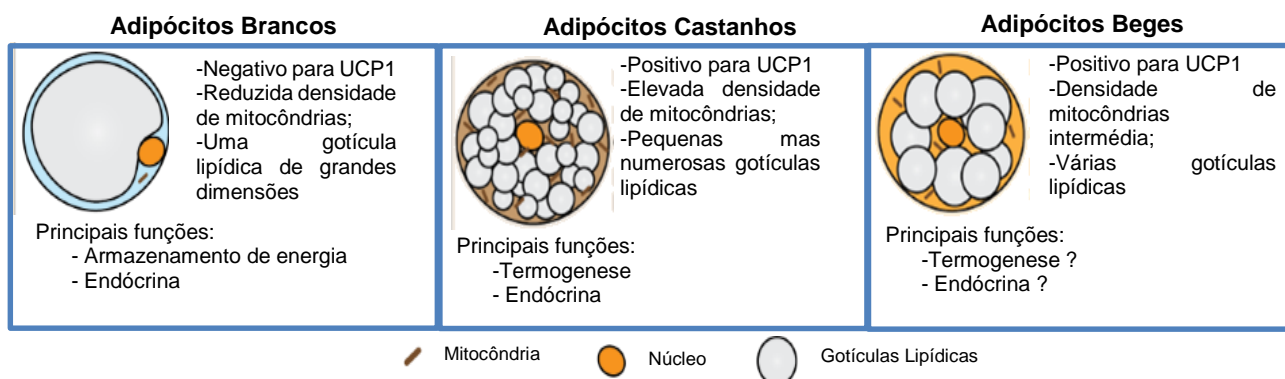


Figura 1.3: Esquema das diferenças morfológicas e funcionais dos três tipos de adipócitos (brancos, castanhos e beges). Adaptado de (Guertin, 2017).

1.3.1.1. Tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco (WAT) compreende a maioria do tecido adiposo. Devido à sua ampla distribuição, trata-se de uma protecção importante contra o choque físico (Trayhurn e Beattie, 2001).

É um reservatório de energia especialmente importante nas horas pós-prandiais. Nas últimas décadas, este tecido, devido aos maus hábitos alimentares, tem contribuído para a obesidade.

Este tecido possui capacidade endócrina, secretando hormonas tais como a adiponectina, a leptina, e outras adipocinas (interleucina 6 (IL-6), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), resistina, por exemplo) que na ausência de obesidade são responsáveis pela manutenção da homeostase energética. Para além disso estas hormonas actuam no sistema imune e desempenham um papel importante na sensibilidade à insulina, angiogénese, pressão arterial e metabolismo lipídico. Contudo, em indivíduos obesos, estas hormonas geram resistência à insulina, pela acumulação de lípidos e desregulação do sistema imune (inflamação) (Figura 1.4) (Kershaw e Flier, 2004; Galic et al., 2009).

Morfológicamente, os adipócitos brancos possuem: um núcleo localizado perifericamente, um organelo esférico de grandes dimensões que funciona como uma gotícula de armazenamento – vacúolo lipídico –, e um número reduzido de mitocôndrias (Figura 1.3) (Zafir, 2013; Betz e Enerbäck, 2015).

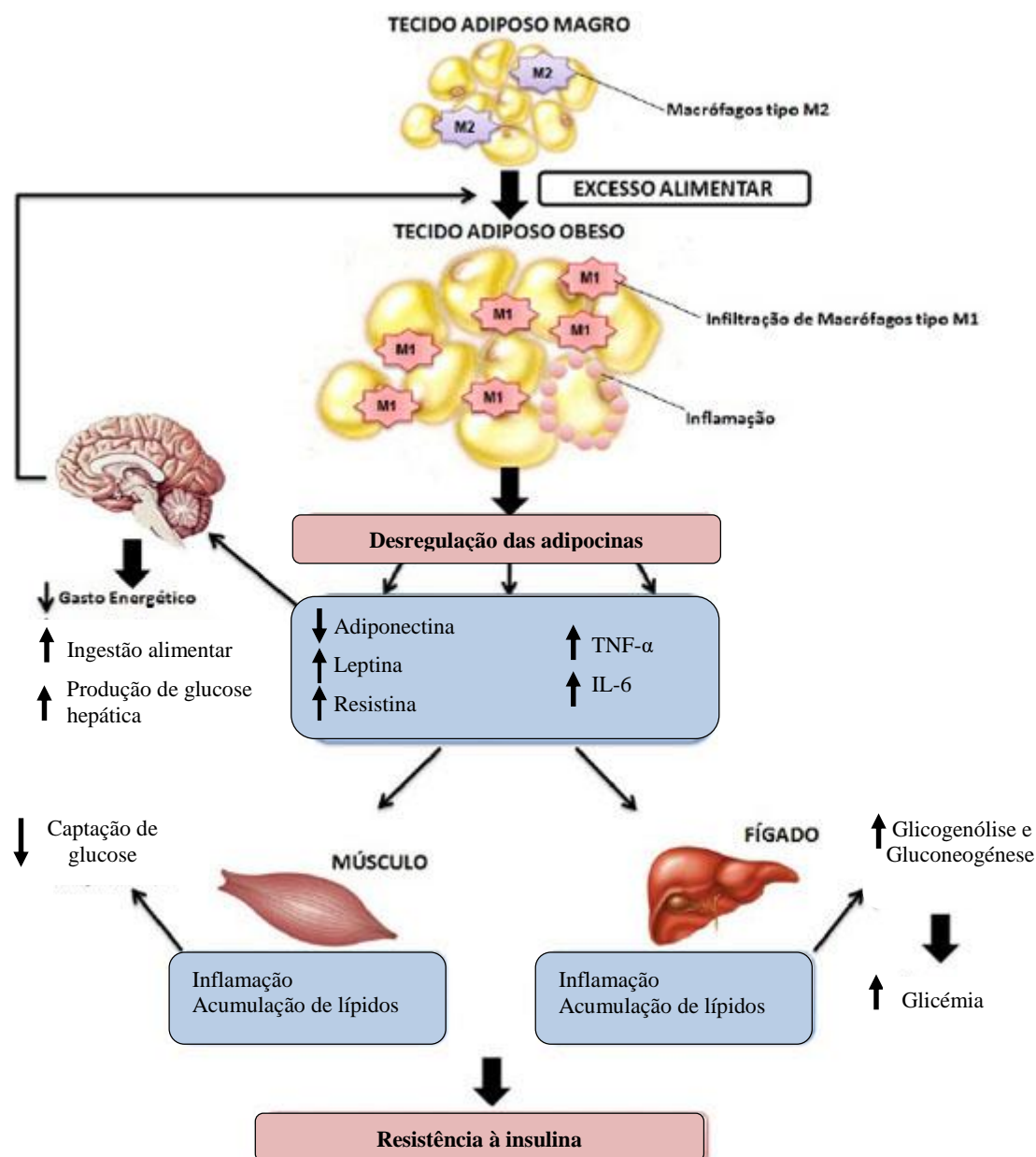


Figura 1.4: Alterações induzidas pela obesidade na secreção de adipocinas e no desenvolvimento da resistência à insulina. A expansão do tecido adiposo na obesidade leva ao aumento da infiltração e inflamação de macrófagos que desencadeia um incremento da libertação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), exacerbando a inflamação do tecido adiposo. A secreção alterada de adipocinas pode levar ao aumento da ingestão de alimentos e redução do gasto energético através da sua acção no hipotálamo e diminuição da sensibilidade à insulina (muscular e hepática) que ocorre devido ao aumento da deposição de lípidos e inflamação. Adaptado de (Galic et al., 2009).

1.3.1.2. Tecido adiposo castanho

O tecido adiposo castanho (BAT) é uma barreira natural contra a hipotermia em mamíferos (Sidossis e Kajimura, 2015). Trata-se do único tecido capaz de converter directamente a energia química em calor, quando activado pelo sistema nervoso simpático (SNS), sendo então, conhecido essencialmente pela sua actividade termogénica (Betz e Enerbäck, 2015).

Nos humanos, o BAT pode ser encontrado nas regiões cervical, supraclavicular, perirenal e paravertebral e ainda no pescoço. Nos roedores, este tecido é maioritariamente encontrado na região interescapular (Sidossis e Kajimura, 2015).

Morfologicamente, o BAT é composto por adipócitos que contém numerosas gotículas lipídicas (lípidos multiloculares) e por um grande número de mitocôndrias de grandes dimensões que expressam uma proteína específica designada por proteína de desacoplamento 1 (UCP1) (Figura 1.3) (Qian et al., 2014). Esta proteína localiza-se no interior da membrana mitocondrial e faz com que o gradiente de prótons diminua por desacoplamento da respiração celular e síntese de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial. Assim sendo, a activação da UCP1, em resposta à exposição ao frio ou à ingestão de alimentos, resulta no aumento da oxidação da glucose e ácidos gordos livres (FFA), mantendo altos níveis de respiração celular no BAT, permitindo a sua actividade termogénica (Cannon e Nedergaard, 2004).

A literatura, tem proposto o BAT como um possível alvo terapêutico contra a obesidade, uma vez que com o aumento da massa de BAT se pressupõe que haja um maior gasto energético.

1.3.1.3. Tecido adiposo bege

Recentemente, foi descrita uma transdiferenciação de WAT em BAT em várias espécies, incluindo no Homem, formando assim um tipo de adipócitos designados por adipócitos beges.

Nos Humanos, este tipo de adipócitos é apenas encontrado na região supraclavicular (Harms e Seale, 2013).

Os adipócitos beges residem, esporadicamente, dentro do WAT, e o seu desenvolvimento é induzido em resposta a situações extremas, como a exposição crónica ao frio e o exercício físico, sendo este processo conhecido por “*Browning*” ou “*Beiging*” (conversão de WAT em BAT). Quando estimulados por condições externas, este tipo de adipócitos expressa UCP1 de forma semelhante à expressada pelos adipócitos castanhos clássicos.

Os dois tipos de tecidos termogénicos (bege e castanho) são distintos morfologicamente. Enquanto os adipócitos castanhos possuem gotículas lipídicas multiloculares separadas de WAT por uma camada de tecido conjuntivo, os adipócitos beges encontram-se sem nenhuma separação tecidular dos adipócitos brancos. Os adipócitos castanhos e beges compartilham várias características bioquímicas, tais como: mitocôndrias enriquecidas, gotículas lipídicas multiloculares e ainda, expressão

de UCP1. No entanto, estes são originários de linhagens celulares distintas (Figura 1.3) (Betz e Enerbäck, 2015; Sidossis e Kajimura, 2015).

Observou-se que a noradrenalina libertada pelos nervos simpáticos é um potenciador do fenómeno de “*Browning*” (Figura 1.5) (Betz e Enerbäck, 2015; Lizcano e Vargas, 2016).

Dada a importância do tecido adiposo castanho ao nível do dispêndio de energia e metabolismo energético celular, “controlar” e de certa forma, despoletar o “*Browning*” poderá traçar um novo rumo em termos de resposta terapêutica para a obesidade e para os efeitos secundários desencadeados por esta.

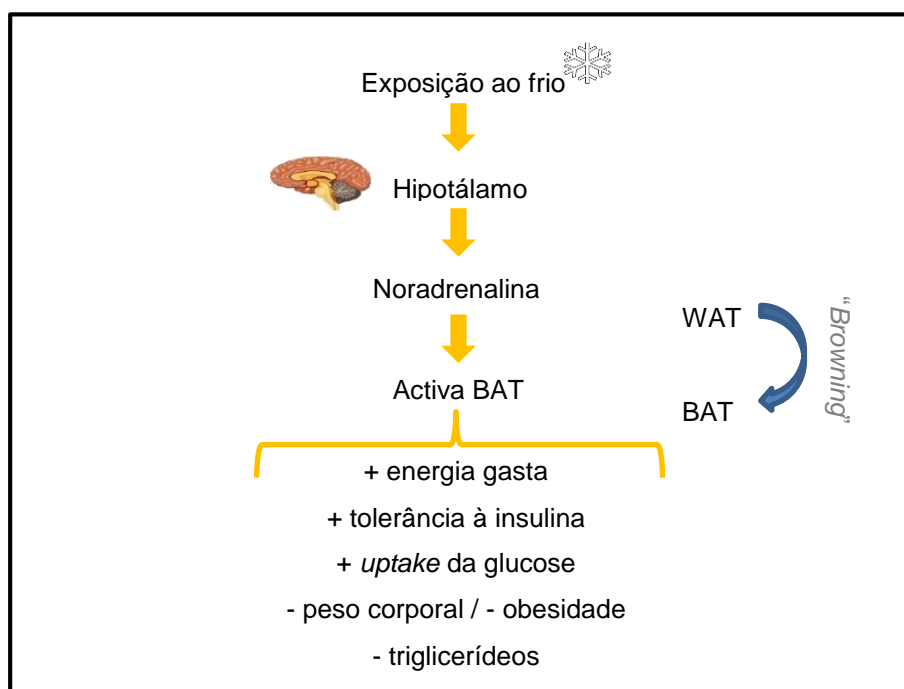


Figura 1.5: Modo de activação de BAT e consequências da sua actividade termogénica. Efeitos na manutenção da homeostasia do processo designado por “*Browning*”.

1.4. Acção da insulina no tecido adiposo e a sua função na homeostasia da glucose

1.4.1. Acção da insulina no tecido adiposo

O tecido adiposo é um dos tecidos sensíveis à insulina. Este possui um papel importante na manutenção da homeostasia da glucose, sendo responsável por cerca de 4% da absorção da glucose (Poretsky, 2010; Shrayyef e Gerich, 2010). No entanto, o papel do tecido adiposo na manutenção da homeostasia da glucose vai muito além da captação de glucose pelo mesmo.

A modulação dos níveis de glucose no organismo feita por este tecido acontece essencialmente por dois mecanismos principais (Kershaw e Flier, 2004; Dyck, 2009):

- regulação dos níveis de FFAs em circulação;
- secreção de adipocinas, que podem afectar a sensibilidade à insulina.

Uma das principais acções da insulina no tecido adiposo é promover a absorção da glucose, conduzindo à lipogénese e por outro lado, inibir a lipólise, evitando assim, o aumento de FFAs na corrente sanguínea.

Como já referido anteriormente, a obesidade é caracterizada por um estado pró-inflamatório que começa no tecido adiposo com uma elevada infiltração de macrófagos e expressão de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1.4). A inflamação inibe a via de sinalização da insulina (Figura 1.9, secção 1.4.3.) nos adipócitos através de vários mecanismos: I) inibição de IRS1 e receptor de insulina na via de sinalização de insulina (White, 2002; Ye e Gimble, 2011); II) Inibição da função do receptor de *peroxisome proliferator-activated* gama (PPAR γ) (PPAR γ conduz a síntese lipídica e o armazenamento de gordura nas células) (Ye, 2008; Ye e Gimble, 2011); III) aumento de FFAs através da estimulação da lipólise e bloqueio da síntese de triglicerídeos (Ye, 2013).

A resistência à insulina no tecido adiposo induz ou agrava a resistência à insulina no fígado e no músculo-esquelético através da formação de metabolitos que alteram a via de sinalização da insulina (Delarue e Magnan, 2007).

1.4.2. Metabolismo da glucose

Ao nível nutricional a glucose é a principal fonte de energia (ATP) necessária ao metabolismo. Assim, a homeostasia da glucose é assegurada pelo equilíbrio entre a sua produção, absorção e metabolização (Saltiel e Kahn, 2001).

Em indivíduos saudáveis, a glucose plasmática permanece entre valores de 4 e 7 mM (70-100 mg/dl) independentemente dos períodos de ingestão ou privação de alimento) (Figura 1.6).



Figura 1.6: Valores de referência de glicémias. Adaptado de (Alexandre e Santos Almeida, 2017).

Durante os períodos pós-prandiais de maior duração (durante o período de descanso, aproximadamente 12 horas), a maioria da glucose existente no organismo é eliminada por tecidos independentes da insulina.

Falando em percentagens de utilização da glucose corporal, 50% é utilizada pelo cérebro, 25% pelo fígado e tecidos gastrointestinais e a restante é utilizada por tecidos insulino-dependentes, como o músculo e o tecido adiposo (Figura 1.7).

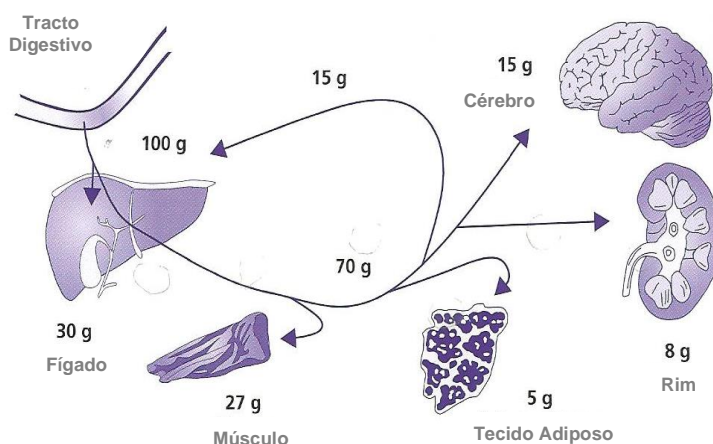


Figura 1.7: Representação esquemática da utilização da glucose corporal. Adaptado de (Gerich, 2000).

O fígado é o órgão responsável por aproximadamente 85% da produção de glucose endógena, sendo que a glicogenólise e a gluconeogénese contribuem de igual forma para a taxa basal de produção hepática. Os restantes 15% são respeitantes à produção pelo rim (DeFronzo, 2004).

Após a ingestão de alimentos, o aumento da concentração de glucose plasmática estimula a libertação de insulina das células β . A combinação entre a hiperinsulinémia e a hiperglicémia suprime a produção de glucose, principalmente ao nível hepático e, estimula a captação de glucose pelos tecidos periféricos (DeFronzo et al., 1992). A grande maioria da captação de glucose nos tecidos periféricos ocorre no músculo e, apenas uma pequena parte, ocorre no tecido adiposo (DeFronzo et al., 1992). Existem diferentes transportadores de glucose, porém o principal transportador que responde à insulina no músculo-esquelético e no tecido adiposo é o GLUT4 (Watson e Pessin, 2001). Apesar de no tecido adiposo apenas uma pequena parte de glucose seja captada, este órgão desempenha um papel fundamental ao nível da homeostasia da glucose em todo o organismo (Boden e Shulman, 2002). A insulina é uma hormona antilipolítica e, deste modo actua no tecido adiposo inibindo a lipólise, o que diminui os níveis de ácidos gordos livres. A acção antilipolítica da insulina ocorre através da sua ligação ao receptor de insulina na superfície da célula, o que inicia a cascata de sinalização que envolve a activação de substratos do IRS e da PI3K (ver secção 1.4.3), o que activa a fosfodiesterase 3A. Esta enzima catalisa a hidrólise da proteína adenosina 5'-monofosfato cíclico (cAMP) em 5'AMP, diminuindo os níveis de cAMP intracelular, o que significa que há uma menor activação da proteína cinase A e da hormona sensível à lipase (HSL). Deste modo, ocorre uma diminuição da hidrólise dos triglicéridos em ácidos gordos e glicerol, ocorrendo assim, a inibição da lipólise (Arner, 2005). Esta diminuição da concentração de FFAs no plasma resulta num aumento da captação de glucose no músculo e, contribui para a inibição da produção hepática de glucose (Bergman, 2000).

Quando a glicémia em jejum excede os 140 mg/dl, as células β pancreáticas deixam de ser capazes de manter a taxa de secreção de insulina elevada. Isto faz com que a concentração de insulina em jejum diminua progressivamente, resultando na diminuição da tolerância à glucose (DeFronzo, 2004).

Também o glucagon desempenha um papel central na regulação da homeostasia da glucose. Após uma noite de jejum, cerca de metade da glucose que é libertada pelo fígado depende da manutenção dos níveis basais de glucagon. Por outro lado, após a ingestão de glucose, a secreção de glucagon é inibida pela hiperinsulinemia, o que contribui para a supressão da produção hepática de glucose e, para a manutenção da tolerância à glucose pós-prandial (DeFronzo, 2004).

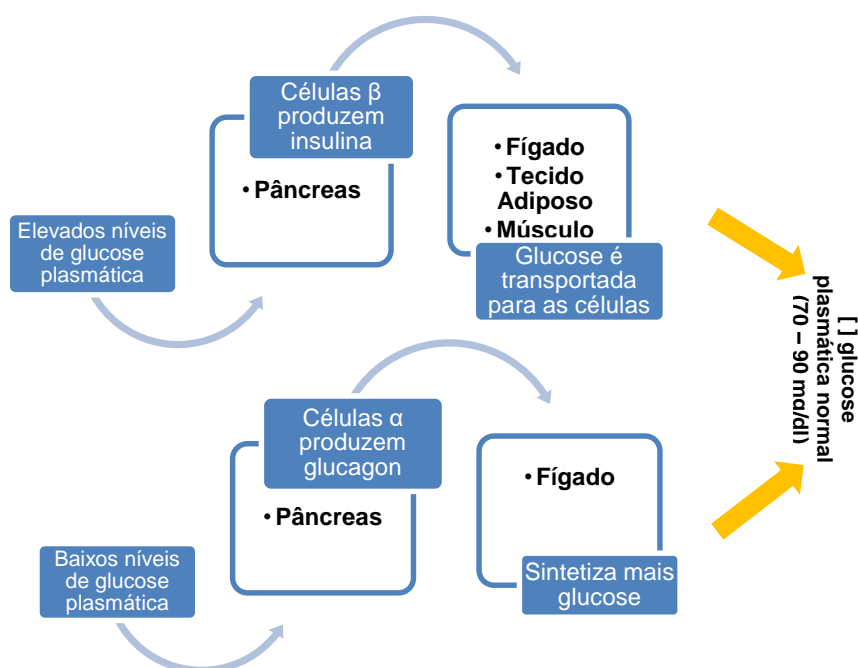


Figura 1.8: Esquema representativo da homeostasia da glucose.

1.4.3. Transporte de glucose nos tecidos e via de sinalização associada ao receptor de insulina

A glucose não consegue atravessar membranas devido à sua natureza hidrofóbica e como tal é captada para o interior das células através de transportadores de glucose (GLUT1 a GLUT12) (Mueckler, 1994; Zhao e Keating, 2007). Nos humanos, a família de transportadores GLUT possui características estruturais comuns em todas as suas isoformas, tais como: uma elevada sequência conservada, 12 domínios transmembranares e o N-glicosilado localizado no primeiro ou no quinto *loop* (Zhao e Keating, 2007; Sun et al., 2012). O principal transportador de glucose para o tecido adiposo, músculo-esquelético e tecido cardíaco é o GLUT4. Para que este transporte ocorra, é necessária a

acção de insulina para que haja translocação de GLUT4 para a membrana (transporte mediado pela insulina) (Figura 1.9) (Watson e Pessin, 2001).

A insulina liga-se a um receptor específico que está presente nos tecidos alvo da desta hormona, sendo este receptor um receptor tirosina cinase, de maneira a exercer o seu papel no metabolismo da glucose. O receptor de insulina é uma glicoproteína formada por quatro subunidades (duas α e duas β). As subunidades α são extracelulares e contêm o domínio de ligação à insulina. As subunidades β apresentam um domínio extracelular, um transmembranar e um intracelular, que quando estimulado pela insulina apresenta actividade tirosina cinase (Saltiel e Kahn, 2001).

O primeiro passo para a acção da insulina reside na ligação de duas moléculas de insulina ao seu receptor que promovem a autofosforilação dos resíduos tirosina cinase das subunidade β e assim a sua activação. Esta activação inicia a ligação de várias proteínas, entre elas, os substratos para o receptor de insulina (IRS) e a proteína SRC (*Src-homology-2-containing protein* (SHC)). A IRS1 está envolvida na captação de glucose estimulada pela insulina e na activação de vias anabólicas no músculo e nos adipócitos. No fígado, a IRS2 é a responsável pelos mesmos processos referidos para a IRS1. A fosforilação da IRS1 e IRS2 conduz à sua associação com o fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K). A activação da PI3K inicia a cascata de sinalização, que activa várias proteínas, entre elas a proteína cinase B (PKB/AKT). A activação da PKB/AKT resulta na translocação de vesículas com transportadores Glut4 para a superfície da célula, o que diminui a concentração de glucose em circulação (Figura 1.10) (Ríos e Fuentes, 2009).

Outra via presente na transdução de sinal do receptor de insulina, ocorre através de Grb2/Sos e ras, o que leva à activação da proteína cinase activada pelo mitogénio (MAPK), que está envolvida no crescimento e diferenciação celular (Figura 1.10) (Cusi et al., 2000).

O cérebro e o fígado utilizam outros transportadores de glucose (GLUT 1,2,3 e 8) que se encontram sempre presentes na membrana e que medeiam o transporte de glucose independente da insulina. Após a entrada da glucose nas células, esta é fosforilada. Esta fosforilação ocorre devido à acção de glucocinases no fígado e na maioria das outras células por acção de hexocinases. Isso evita que a glucose saia da célula, excepto se houver enzimas fosfatase para remover o fosfato, como no caso de células hepáticas. Após a fosforilação, a glucose pode ser utilizada na via glicolítica para produção de energia ou convertida em um composto de armazenamento (glicogénio ou gordura) (Guyton e Hall, 2006).

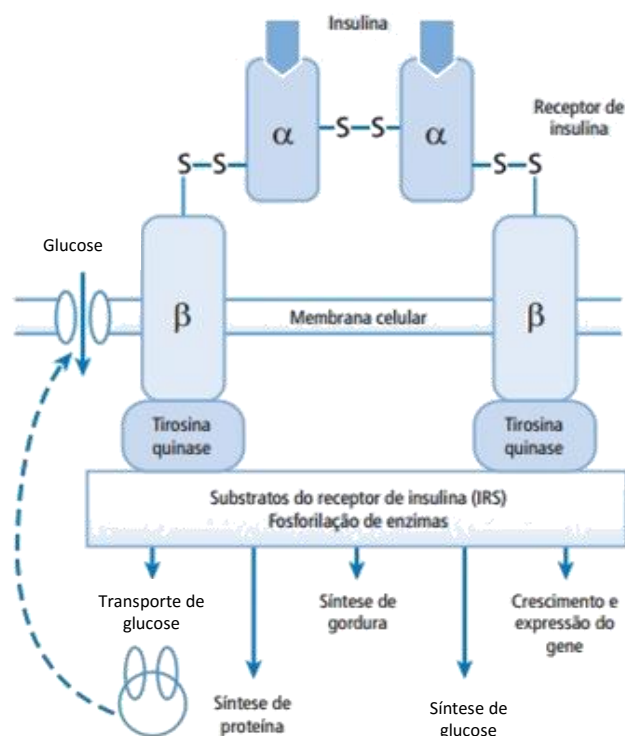


Figura 1.9: Esquema representativo do transporte de glucose para os tecidos (transporte mediado pela insulina). Adaptado de (Guyton e Hall, 2006).

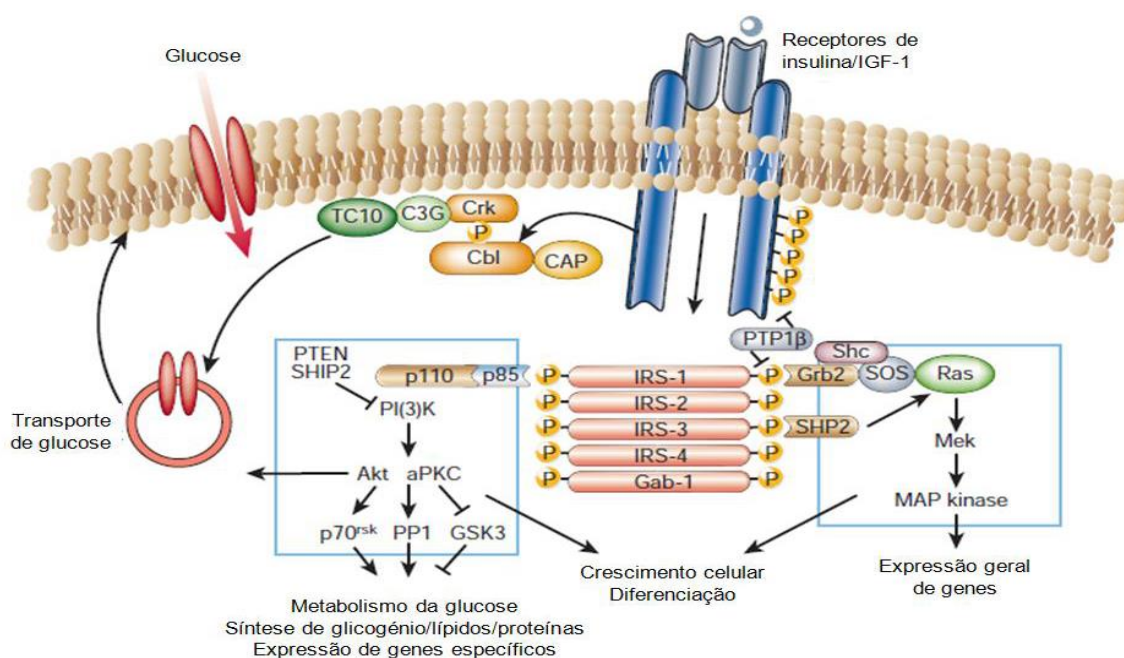


Figura 1.10: Via de transdução de sinal da insulina. Encontra-se representado o receptor de insulina e algumas moléculas envolvidas na sua acção. Adaptado de (Saltiel e Kahn, 2001).

1.5. Corpo Carotídeo: um quimiorreceptor periférico

Os Corpos Carotídeos (CBs) são pequenos órgãos pares localizados na bifurcação das artérias carótidas comuns. São inervados por fibras nervosas do glossofaríngeo (nervo do seio carotídeo - CSN), do nervo vago e do nervo simpático do gânglio cervical nas proximidades superiores. Os CBs recebem sangue através de um ramo arterial decorrente da artéria carótida interna ou externa (González et al., 1995; Kumar e Bin-Jaliah, 2007; Paton et al., 2013) (Figura 1.11).

Os CBs são compostos por dois tipos de células: células do tipo I, também designadas por células quimiorreceptoras ou células glómicas, que têm origem na crista neural e possuem vesículas claras ou escuras; e células do tipo II, denominadas, também, por células de sustentação, que são semelhantes às células gliais do sistema nervoso central (Iturriaga e Alcayaga, 2004).

Estes órgãos são quimiorreceptores arteriais classicamente descritos como sensores de oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), uma vez que são capazes de detectar diminuições de O_2 e aumento de CO_2 e alterações no pH do sangue arterial. Estes são cruciais na resposta à hipóxia aguda, e em realizar ajustes circulatórios para garantir a correcta oxigenação e distribuição sanguínea em mamíferos (González et al., 1992; López-Barneo, 2003). No entanto, mais recentemente foram identificadas outras funções para estes quimiorreceptores periféricos para além da detecção das alterações nos gases arteriais, tendo sido postulada uma função ao nível da homeostasia da glucose (Koyama et al., 2000; Ribeiro et al., 2013; Conde et al., 2014; Sacramento et al., 2017).

Quando os CBs detectam alguma alteração nos níveis de O_2 , CO_2 ou pH, as células quimiorreceptoras libertam neurotransmissores como o ATP e a adenosina que actuam nos seus receptores pós-sinápticos no CSN, aumentando a frequência dos potenciais de acção. Este aumento de actividade eléctrica do CSN é integrada no tronco cerebral, induzindo um conjunto de reflexos respiratórios, com o intuito de normalizar os gases sanguíneos alterados através da hiperventilação e irão, também, estabilizar a pressão sanguínea e o ritmo cardíaco recorrendo à activação do sistema nervoso simpático (SNS) (González et al., 1995; Conde et al., 2012).

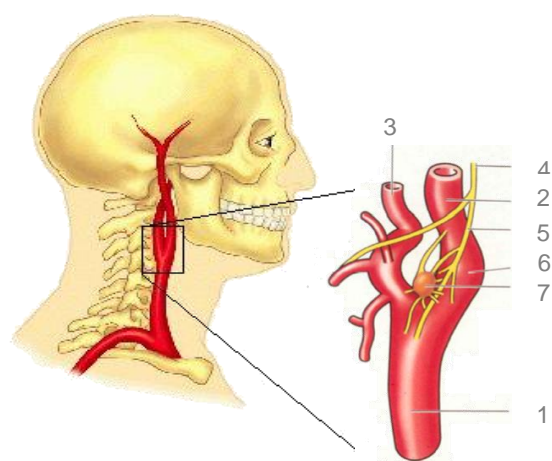


Figura 1.11: Representação esquemática da localização e constituição do Corpo Carotídeo. Encontram-se representados: a artéria carótida comum (1) que se divide em interna (2) e externa (3); (4) nervo glossofaríngeo ; (5) nervo do seio carotídeo; (6) seio carotídeo ; (7) corpo carotídeo.

1.5.1. Papel do corpo carotídeo na homeostasia energética

A ideia de que o corpo carotídeo está envolvido no controlo do metabolismo da glucose não é recente, existindo diversos estudos dos anos 80 e 90, que demonstraram que a estimulação do corpo carotídeo levava a um aumento da libertação de glucose hepática (para uma revisão ver Conde et al., 2014). No início dos anos 2000, (Koyama et al., 2000), demonstrou que os CBs desempenham um papel fulcral no metabolismo da glucose, uma vez que cães submetidos à desnervação do nervo do seio carotídeo apresentavam níveis baixos de glucagon em condições basais e níveis reduzidos de glucagon e cortisol durante uma hipoglicemia induzida pela insulina conjuntamente com uma diminuição marcada da produção hepática de glucose em resposta à hipoglicemia e com um aumento da sensibilidade à insulina. Estes resultados levam a crer que a ressecção do nervo do seio carotídeo afecta a resposta à hiperinsulinemia e que o papel do CB no controlo do metabolismo da glucose não parece estar relacionado com a resposta contra-regulatória à hipoglicemia. Estes resultados estão de acordo com os obtidos mais recentemente no Homem por Wehrwein (Wehrwein et al., 2010).

Mais recentemente, demonstrou-se que o CB não tem só um papel fulcral na homeostasia da glucose/energética em condições fisiológicas como tem um papel fundamental no desenvolvimento de resistência à insulina periférica e intolerância à glucose em modelos animais de pré-diabetes e síndrome metabólico induzidos por dietas hipercalóricas (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017).

De facto em 2013, foi demonstrado em modelos animais de resistência à insulina obtidos por dietas hipercalóricas (animais submetidos a 3 semanas dieta rica em lípidos ou 4 semanas dieta rica em 35% de sacarose) que existe uma hiperactividade dos CBs, já que estes órgãos nestes animais apresentam uma maior libertação de dopamina, um neurotransmissor essencial na transmissão neuronal no órgão, em resposta à hipóxia assim como um aumento da atividade da tirosina hidroxilase, a enzima limitante na síntese de catecolaminas (Ribeiro et al. 2013). Observou-se também que esta sobreactivação dos CBs na insulino-resistência era notória ao nível da ventilação basal assim como uma ventilação em resposta à hipóxia isquémica que se encontravam aumentadas (Ribeiro et al. 2013). O papel fulcral dos CBs no controlo periférico da sensibilidade à insulina e tolerância à glucose foi demonstrado, uma vez que a desnervação crónica bilateral do CSN não só previne o desenvolvimento de insulino-resistência, como reverte a insulino-resistência e a intolerância à glucose nos animais com dieta hipercalórica (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017). Para além disso observou-se que a desnervação do CSN normaliza o aumento da glucose e insulina plasmática em jejum, os FFAs e a hiperactividade simpática sistémica observada nestes modelos animais de pré-diabetes e síndrome metabólico (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017).

Observou-se também que a desnervação crónica do CSN previne o ganho de peso e o incremento de gordura visceral nos animais sujeitos a uma dieta hipercalórica (HF) (Ribeiro et al., 2013).

Outras características fisiopatológicas centrais de doenças metabólicas, são os níveis aumentados de triglicéridos plasmáticos e colesterol LDL acompanhados pela diminuição dos níveis de colesterol HDL, uma vez que estes níveis são afectados pela resistência à insulina. Observou-se também que a desnervação do CSN restaura o perfil lipídico nos modelos animais de insulino-

resistência e intolerância à glucose induzidos por dietas hipercalóricas, já que a ressecção do CSN diminui os níveis de triglicérideos plasmáticos e aumentou significativamente os níveis do colesterol HDL (Sacramento et al.,2017).

Estes efeitos benéficos da desnervação bilateral do CSN parecem provir da recuperação do *uptake* de glucose no tecido adiposo visceral e fígado assim como da recuperação da sinalização da insulina quer no tecido adiposo quer no músculo-esquelético (Sacramento et al., 2017). Assim, o efeito da sinalização CSN-tecido adiposo parece ter um papel fulcral no desenvolvimento da resistência à insulina e a modulação desta ligação entre o CB e o tecido adiposo “abre portas” para o desenvolvimento de estratégias que reduzam a actividade neural dos CBs de maneira a tratar patologias que se consideram uma epidemia global como a obesidade.

2. OBJECTIVOS

Dado a presente epidemiologia da obesidade e o papel crucial do corpo carotídeo na homeostasia energética, o presente trabalho tem como objectivo geral avaliar a modulação da actividade do CSN como uma possível intervenção terapêutica no tratamento da obesidade.

Assim, os objectivos específicos desta tese foram avaliar num modelo de obesidade obtido pela ingestão de dieta hipercalórica:

1. O impacto da desnervação do CSN no ganho de peso, na percentagem de massa gorda total e por tecido e na deposição de lípidos;

2. O impacto da desnervação do CSN na sensibilidade à insulina, tolerância à glucose e níveis de insulinémia e péptido C;

3. O impacto da desnervação do CSN na ventilação basal e nas respostas à hipóxia e hipercapnia;

4. O impacto da desnervação do CSN na função hemodinâmica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo animal e procedimento experimental

Para o presente estudo utilizaram-se ratas *Wistar* do sexo masculino com 9 semanas de idade. Estes animais foram obtidos a partir do biotério da NOVA *Medical School*/Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. As ratas permaneceram no recobro, em gaiolas onde se encontravam duas a duas, com condições de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humidade ($55 \pm 10\%$) e número de horas de luz (12 horas diárias) controladas.

De maneira a obter um modelo de obesidade, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um dos quais foi submetido a uma dieta hipercalórica (HF) (5,1 Kcal/g) (*TestDiet*, St.Louis, Missouri – 18,1 % proteína + 61,6% gordura + 20,3 % hidratos de carbono) durante 10 semanas. O outro grupo era o grupo controlo e durante o mesmo período de tempo foi submetido a uma dieta *standard* (2,56 Kcal/g) (RM1, *Special Diets Services*, Reino Unido – 17% proteína + 7,4% gordura + 75% hidratos de carbono).

Antes do início da dieta, os animais foram submetidos a uma avaliação metabólica na qual foi avaliada a sensibilidade à insulina através de um teste de tolerância à insulina (ITT) e a tolerância à glucose via um teste de tolerância oral à glucose (OGTT). No fim do período de dieta estabelecido (10 semanas), o desenvolvimento de resistência à insulina e intolerância à glucose foi confirmado através da realização dos mesmos testes. Após, esta confirmação os grupos de ratas controlo e obesos foram divididos aleatoriamente e metade do grupo submetido a uma ressecção bilateral do CSN (Figura 3.1) e a outra metade a uma cirurgia *sham*, na qual se efectuou o mesmo procedimento cirúrgico mas sem o corte do CSN. Este procedimento cirúrgico foi efectuado em condições assépticas após anestesia intraperitoneal (i.p.) com cetamina (75mg/kg)/ medetomidina (0,5 mg/kg). Após o procedimento cirúrgico e sutura procedeu-se à administração de um reversor da anestesia (Antisedan, Atipamezol, 0,25 mg/kg/2ml, i.p.). No dia do procedimento cirúrgico, após os animais estarem totalmente acordados foi administrada brupenorfina (Bupaq, 10 $\mu\text{g/kg}$) como analgésico. No dia da cirurgia, e nos 3 dias de pós-operatório foi ainda administrado o carprofeno como anti-inflamatório (Rimadyl, 5mg/kg/ml).

Após os procedimentos cirúrgicos, os modelos animais foram mantidos nas respectivas dietas.

Durante todo o estudo foi monitorizado o peso dos animais, a sua ingestão calórica e o seu comportamento, assim como os parâmetros metabólicos medidos através do ITT e do OGTT e ventilatórios medidos através da medição da ventilação basal e em resposta à hipóxia e hipercapnia por pletismografia em animais conscientes e em livre movimento. Os ITTs, OGTTs e pletismografias

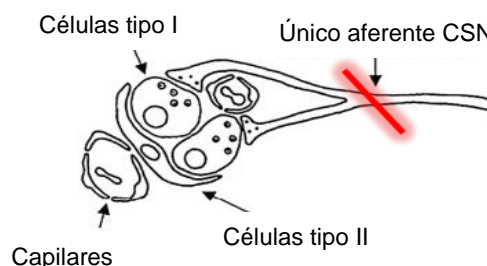


Figura 3.1: Esquema representativo do procedimento cirúrgico correspondente ao corte do CSN.

(para garantir que a desnervação tinha ocorrido correctamente) foram realizados a todos os animais após a primeira semana de cirurgia e depois quinzenalmente. Nove semanas após a cirurgia e depois de se realizarem os respectivos testes metabólicos e pletismografias, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60mg/kg i.p, Pentobarbital, Eutasil), foi realizado o registo da atividade do SNS e monitorizada a pressão arterial através da cateterização da artéria femoral. Após isto, foi recolhido sangue por punção cardíaca para monitorização posterior de vários biomarcadores. Após laparotomia abdominal, os tecidos adiposos visceral, renal, genital, subcutâneo e castanho foram recolhidos, pesados e conservados a -80°C para posterior análise. Para além destes tecidos, foram recolhidas amostras de fígado, gastronecmius, soleus, diafragma, hipotálamo, corpos carotídeos, medula supra renal, artérias renal, aorta e pulmonar e rim para possíveis análises à posteriori (Figura 3.2).

Os princípios de cuidados laboratoriais foram seguidos de acordo com a Directiva da União Europeia para a Protecção de Vertebrados utilizados para fins experimentais e científicos (2010/63/UE), sendo os protocolos experimentais aprovados pelo Comité de Ética da Faculdade de Ciências Médicas.

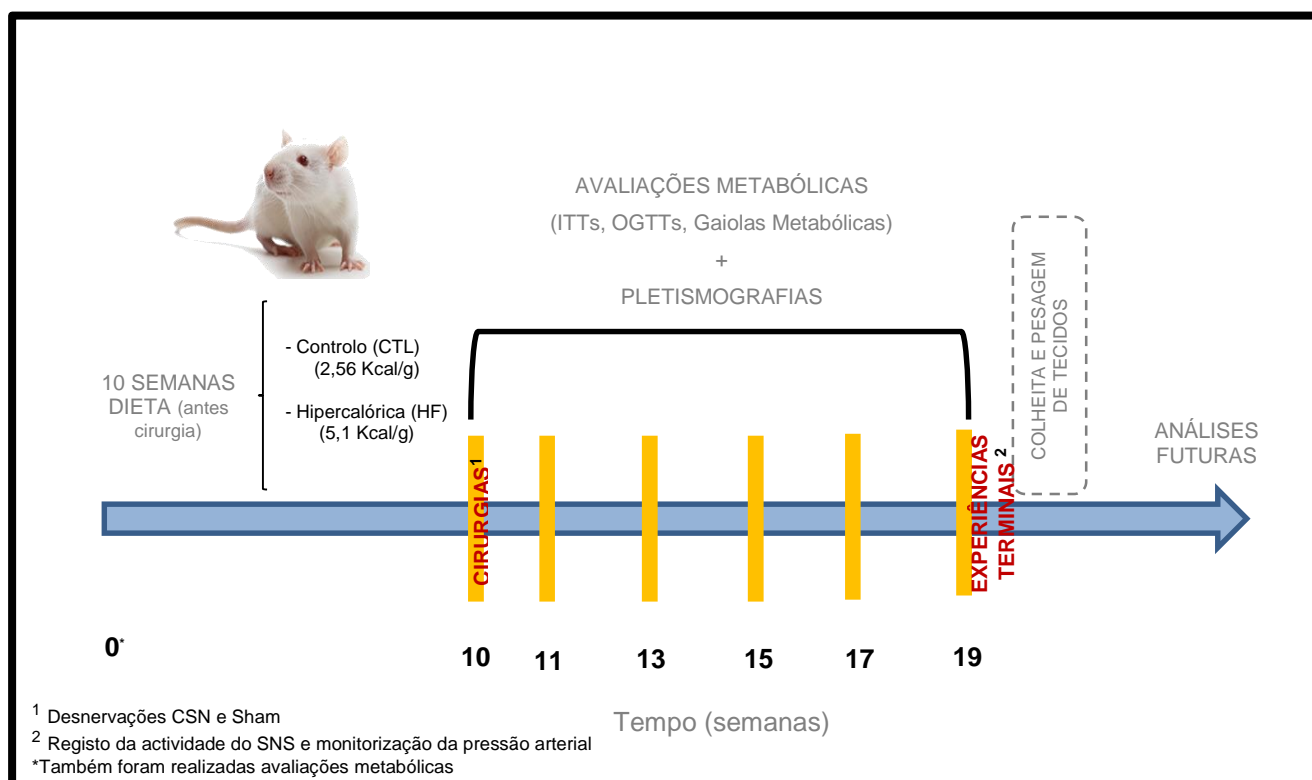


Figura 3.2: Esquema representativo do protocolo experimental realizado em ratas *Wistar*. Os roedores foram divididos aleatoriamente em dois grupos e sujeitos, durante 10 semanas, a dietas controlo (CTL) (2,56 Kcal/g) e hiperclórica (HF) (5,1Kcal/g) para mimetizar o modelo patológico de obesidade. Os animais foram avaliados antes das dietas (*baseline*), antes do procedimento cirurgico (semana 10), 1 semana pós-cirurgia e depois cada 2 semanas até à semana 9 pós-cirurgia. Após a 9 semana pós-cirurgia realizaram-se experiências terminais, nas quais foi avaliada a actividade do SNS, medida a pressão arterial e os tecidos foram colhidos e pesados para análises posterior. Durante todo o estudo foi monitorizado o peso dos animais e a sua ingestão calórica.

3.2. Teste Metabólicos

3.2.1. Testes de tolerância à insulina

Os testes de tolerância à insulina (ITT) foram desenvolvidos para avaliar a sensibilidade à insulina *in vivo* (Monzillo e Hamdy, 2003). Após um jejum nocturno de aproximadamente 15 horas, é feita a avaliação da glicémia basal através da medição da glucose no sangue pelo método de *tail tipping* com um medidor de glucose *FreeStyle Precision* (Abbott Diabetes Care, Portugal). Após a medição da glicemia basal, procedeu-se à administração intravenosa na veia da cauda de um *bolus* de insulina de 0,1 U (4,5 mg) /Kg de peso corporal (Humulin regular 100UI/ml, Lilly) seguido da medição do declínio na concentração de glucose no plasma durante 15 minutos, sendo as glicémias medidas em intervalos de 1 minuto (Kinzig et al., 2010; Conde et al., 2012).

Para a avaliação da sensibilidade à insulina é utilizada a constante do teste de tolerância à insulina (KITT) e que se correlaciona directamente com a sensibilidade à insulina. A taxa constante para o desaparecimento da glucose (KITT) foi calculada utilizando a fórmula $[0,693 / t_{1/2}]$, na qual o valor $t_{1/2}$ representa o tempo médio de vida da glucose e foi calculado a partir da inclinação da curva pela análise do método dos mínimos quadrados das concentrações plasmáticas de glucose durante a fase de decaimento linear (Ribeiro et al., 2013) (Figura 3.3).

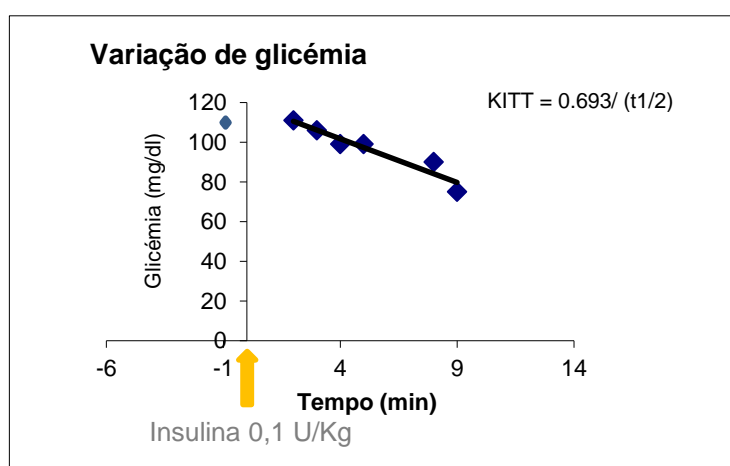


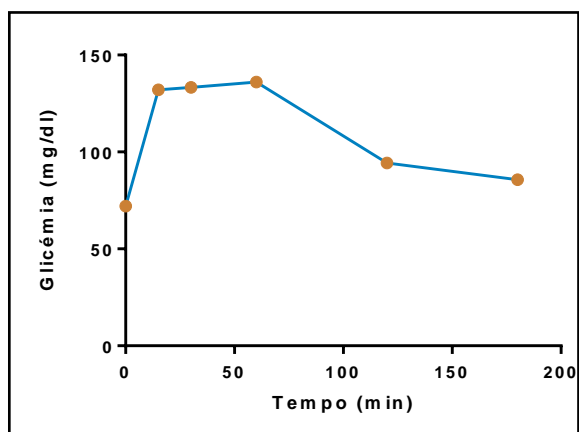
Figura 3.3: Curva representativa da diminuição da glucose no teste de tolerância à insulina em ratazanas.

3.2.2. Testes de tolerância oral à glucose

O teste de tolerância oral à glucose (OGTT), é um método utilizado para avaliar a tolerância a uma administração exógena de glucose, avaliando assim a libertação de insulina em resposta à glucose e a sensibilidade do tecido periférico à acção desta hormona (Monzillo e Hamdy, 2003).

Para a realização deste teste é administrada aos animais uma solução salina de glucose (2g/kg, VWR Chemicals, Leuven, Bélgica) por gavagem, após um jejum noturno de aproximadamente 15 horas.

Antes da administração da glucose, é feita uma medição da glicémia basal pelo método de *tail tipping*, recorrendo a um *Glucometer* da *Freestyle Precision* (Abbott Diabetes Care, Portugal). Após a administração da glucose, as concentrações de glucose no plasma são medidas aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos a partir do sangue colhido da extremidade da cauda da ratazana. Os valores das glicémias vão diminuindo ao longo das 3 horas, aproximando-se dos valores basais, em animais controlo, ao fim das 3 horas de teste. Contudo, quando os animais são intolerantes à glucose (animais obesos) as glicémias no final do teste, não retornam a valores controlo.



Através da curva de excursão de glucose durante os 180 minutos é calculada a áreas sob a curva (AUC) (Figura 3.4) que se utiliza para comparar a tolerância à glucose. Quanto menores as AUC, maior será a tolerância à glucose.

Figura 3.4: Curva representativa das glicémias de animais controlo obtidas ao longo de um teste de tolerância à glucose oral.

3.2.3. Avaliação do balanço energético: quantificação da diurese e das fezes

Para avaliar a evolução do balanço energético dos animais em estudo, estes foram colocados em gaiolas metabólicas, durante a noite (aproximadamente 16 horas), sendo este o período de maior actividade das ratazanas, para que seja quantificada a diurese e as fezes dos animais. Estas gaiolas permitem um controlo da dieta e água colocadas, consumidas e desperdiçadas, bem como recolher a urina e as fezes, sendo estas conservadas a uma temperatura refrigerada, permitindo análises futuras.

Os animais de ambos os grupos foram sujeitos a esta avaliação, antes de serem submetidos à dieta, na semana antes da cirurgia, na primeira semana após cirurgia e posteriormente, quinzenalmente até à nona semana após cirurgia. Antes da primeira análise, as ratazanas foram colocadas nas gaiolas metabólicas, dando-se o período de adaptação para evitar que o factor stress influencie os resultados.

Assim, será possível avaliar, de forma relativa, o aumento, diminuição ou manutenção, do metabolismo dos roedores.

3.3. Pletismografias

Para avaliar a função respiratória dos animais sujeitos às diferentes dietas e o correcto corte do CSN (através da diminuição da resposta à hipóxia aguda), foi avaliada a ventilação basal dos animais assim como a resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia, em ratas conscientes, recorrendo à técnica de pletismografia (Gonzalez-Martin et al., 2009). Utilizou-se um pletismógrafo (*Emka Technologies*, Paris, França) composto por quatro câmaras. Estas câmaras foram calibradas nos dias do estudo, injectando um volume de 20 ml de ar. Uma vez calibrado o sistema, colocou-se um animal em cada câmara do pletismógrafo, estando exposto ao ar ambiente durante 30 minutos de maneira a aclimatiza-los às respectivas câmaras para obterem um comportamento de repouso. Todos os testes respiratórios foram realizados no horário diurno. Após a aclimatização dos animais às câmaras, foi aplicado um fluxo contínuo (2ml/min) de uma mistura de gases, determinada segundo o respectivo protocolo experimental (Figura 3.5):

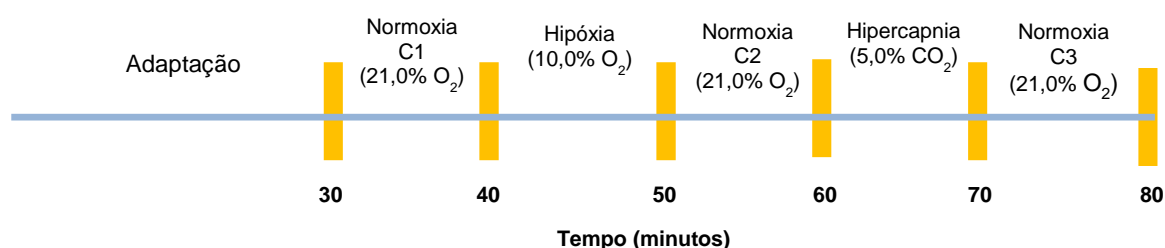


Figura 3.5: Protocolo experimental de pletismografia em animais conscientes e em livre movimento. Pretendeu-se avaliar as diferenças na ventilação basal (normóxia, 21,0% O₂) e em resposta a a uma redução de oxigénio (hipóxia, 10,0% O₂) e a um aumento de dióxido de carbono (hipercapnia, 5,0% de CO₂ + 21,0% O₂).

Usando o *software Iox 2.9.5.73* (*Emka Technologies*, Paris, França), foi possível obter a frequência respiratória (*f*; respirações/min; bpm) e o volume tidal (*VT*; ml/Kg), através dos quais se calcula o volume minuto (*MV*; ml/min/Kg), que é o produto de ambos os parâmetros anteriores. Quer o volume tidal quer o volume minuto são corrigidos para o peso do animal.

Este ensaio foi realizado nos mesmos períodos que os testes metabólicos referidos anteriormente (secções 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3).

3.4. Medição da pressão arterial média

Para determinar a pressão arterial média (MBP) colocou-se um cateter na artéria femoral, estando este ligado a um transdutor de pressão (-50, +300 mmHg, *Emka Technologies*, Paris, França) e a um amplificador de pressão (*Emka Technologies*, Paris, França). A pressão arterial média foi adquirida através do *software Iox 2.9.5.73* (*Emka Technologies*, Paris, França).

3.5. Conteúdo total de lípidos no fígado

Para avaliar o impacto da secção bilateral do CSN no conteúdo total de lípidos no fígado, foi quantificada a percentagem de lípidos total no fígado de animais sujeitos à dieta hipercalórica e à dieta *standard* com e sem corte do CSN utilizando um método adaptado do método de extracção descrito por Folch (Folch et al., 1957).

Começou-se por pesar uma porção de tecido a qual se homogeneizou recorrendo a um homogeneizador automático (IKA, Alemanha), numa solução de Folch (Clorofórmio: Metanol 2:1 v/v). A homogeneização de todos os tecidos foi sempre efectuada nas seguintes proporções: 3ml da solução de Folch para cada 0,5g de fígado. De seguida, as amostras foram agitadas durante 2 horas num agitador automático e após este tempo, foram filtradas, com papel de filtro, recolhendo o filtrado para outro tubo de ensaio de vidro. Ao tecido que restava, adicionava-se sempre 2,5ml da solução de Folch, e colocava-se a agitar novamente 2 horas, realizando uma nova filtração no fim desse período. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Quando todos os filtrados já se encontravam no mesmo tubo, adicionou-se 2ml de NaCl 0,73% a cada um dos mesmos procedendo-se à sua mistura num vortex e deixando repousar durante a noite. Após este período de repouso, era possível distinguir duas fases, tendo-se procedido à recolha da fase 1 (F1) que se encontra no fundo do tubo de ensaio (solvente utilizado mais denso do que a água), dado que esta correspondia à fase orgânica, transferindo-a para uma placa de petri de vidro previamente tarada (Figura 3.6).

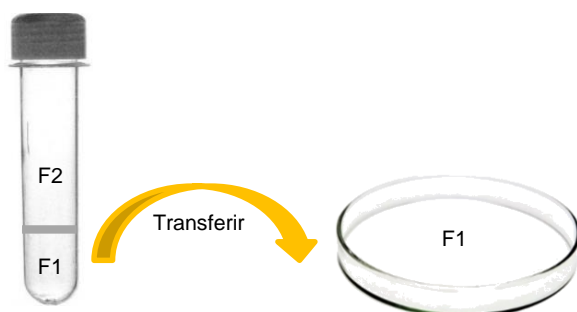


Figura 3.6: Esquema representativo do protocolo adoptado para avaliar o conteúdo total de lípidos no fígado. A fase 1 (F1) trata-se da fase orgânica, que posteriormente é transferida para a placa de petri.

A fase 2 (F2) foi reaproveitada, acrescentando-se 2,5ml da solução de Folch: NaCl 0,58% (80:20). Agitou-se e deixou-se repousar durante duas horas, após as quais se voltou a obter duas fases. A F1 foi novamente aproveitada, juntando-se à placa de petri com a F1 inicial, sendo agora a F2 descartada.

Deixou-se secar ao ar o conteúdo existente na placa durante 24 horas, tendo sido o conteúdo pesado ao final desse tempo e obtendo-se assim o peso correspondente aos lípidos existentes no fígado. Os resultados foram expressos em percentagem de lípidos por peso total de fígado homogeneizado.

3.6. Quantificação de biomarcadores no soro e/ou plasma

Ao longo de todo o período experimental e após os OGTT, foi recolhido sangue da veia da cauda para quantificação da concentração de insulina e o péptido C. O sangue recolhido foi centrifugado numa centrífuga refrigerada (Eppendorf, Madrid, Espanha) a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, obtendo-se assim, aproximadamente 30-40 µl de soro. Para estas quantificações, recorreram-se a Kits comerciais de ELISA (*Mercodia Ultrasensitive Rat Insulin* e *Mercodia Rat C-peptide*, respectivamente; Mercodia AB, Uppsala, Suécia).

Apenas foram avaliadas as amostras de soro correspondentes às semanas:

- anterior ao início da dieta;
- antes da cirurgia (10 semanas de dieta);
- primeira após cirurgia;
- nona após cirurgia.

Para a quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) foi utilizado plasma obtido do sangue recolhido por punção cardíaca na experiência terminal (9 semanas pós-cirurgia, após realização das últimas avaliações metabólicas). O sangue foi colhido para tubos de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) mantidos no gelo. As amostras foram centrifugadas numa centrífuga refrigerada (Sigma, Madrid, Espanha) a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C.

Para quantificar o NO/ NO₃⁻, as amostras de plasma foram desproteinizadas pela adição de dois volumes de etanol (0°C). Após 30 minutos em gelo, as amostras foram centrifugadas numa centrífuga (Eppendorf, Madrid, Espanha) a 13000 rpm durante 10 minutos.

A concentração de NO/ NO₃⁻ foi determinada recorrendo a uma técnica específica e sensível de quimiluminescência de NO/ozono (NO-Analyzer 280, Sievers Research Inc., Boulder, Colorado, EUA).

3.7. Análise estatística

Para a análise de dados foi utilizado o Software *GraphPad Prism*, versão 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e estes foram apresentados com valores médios ± SEM. As diferenças significativas entre os valores médios foram calculadas por *One* ou *Two-way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo no ganho de peso, na massa gorda corporal e nos parâmetros lipídicos

4.1.1. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica do CSN no ganho de peso

Na figura 4.1, encontra-se representado o efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica do CSN no ganho de peso. Tal como seria de esperar, os animais submetidos a uma dieta hipercalórica apresentam uma curva de crescimento e um ganho de peso superior aos animais submetidos a uma dieta *standard* (peso CTL antes dieta = $0,183 \pm 0,02$ Kg; peso CTL 10 semanas dieta = $0,373 \pm 0,04$ Kg; peso HF antes dieta = $0,183 \pm 0,03$ Kg; peso HF 10 semanas dieta = $0,485 \pm 0,05$ Kg) (Figura 4.1 A).

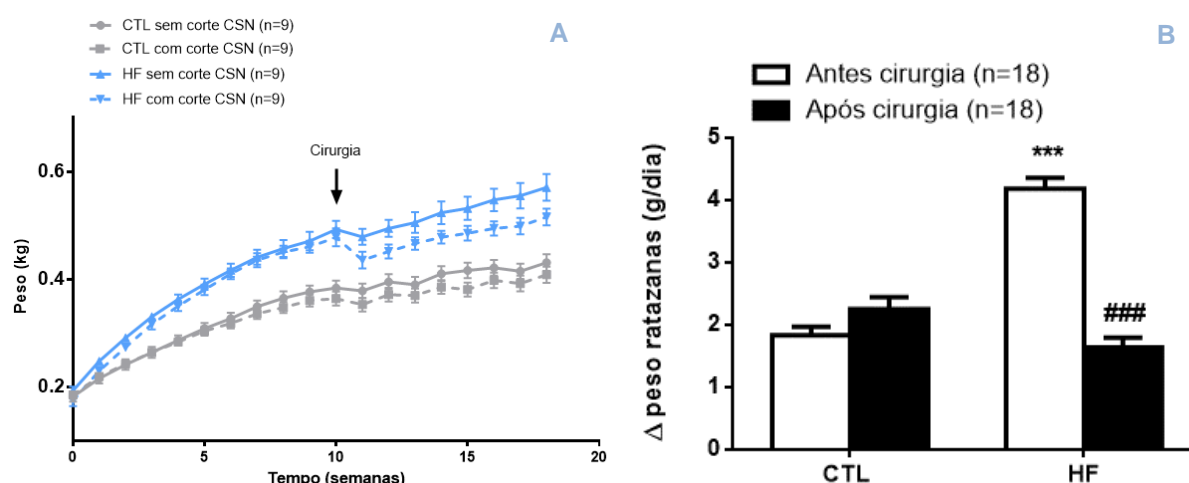


Figura 4.1.: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN no ganho de peso dos animais. **A:** Curva de crescimento dos animais ao longo das semanas de dieta (semana 1 a 18). **B:** análise da variação de peso (g/dia) respeitante às semanas 6 a 10 e 12 a 18. One e *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: *** $p < 0,001$, compara HF antes da cirurgia com valores controlo; ### $p < 0,001$, compara HF depois da cirurgia com HF antes da cirurgia.

Quando observamos a figura 4.1, é evidente uma diminuição no ganho de peso dos HF com a desnervação crónica do CSN. Contudo, esse efeito é mais notório quando excluimos as semanas relativas à curva de crescimento (semanas 1 a 5) e a semana imediatamente a seguir à cirurgia (semana 11), na qual é normal os animais perderem peso devido à recuperação do procedimento cirúrgico. Assim, se expressarmos desta forma a variação de peso das ratazanas (g/dia) (Figura 4.1 B),

os animais HF com corte do CSN apresentam uma diminuição de ganho de peso de 61% (Δ peso HF sem corte CSN = $29,3 \pm 1,2$ g/dia; Δ peso HF com corte CSN = $11,5 \pm 1,1$ g/dia). Este efeito da desnervação do CSN no ganho de peso não foi observado em animais controlo (Δ peso CTL sem corte CSN = $12,8 \pm 0,9$ g/dia; Δ peso CTL com corte CSN = $15,8 \pm 1,4$ g/dia).

4.1.2. Efeito da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na ingestão calórica

De maneira a tentar perceber se o efeito da ressecção do CSN no ganho de peso se devia a alterações na ingestão calórica dos animais, foi calculada a ingestão ao longo de todo o estudo. Observou-se que este efeito é independente da ingestão calórica dos animais, uma vez que não se verificaram diferenças significativas antes e após cirurgia (CTL sem corte CSN antes cirurgia = $197,6 \pm 9,7$ Kcal/dia/Kg; CTL sem corte CSN após cirurgia = $218,8 \pm 30,2$ Kcal/dia/Kg; CTL com corte CSN antes cirurgia = $215,2 \pm 7,1$ Kcal/dia/Kg; CTL com corte CSN após cirurgia = $217,2 \pm 19,9$ Kcal/dia/Kg; HF sem corte CSN antes cirurgia = $280,1 \pm 29,8$ Kcal/dia/Kg; HF sem corte CSN após cirurgia = $301,6 \pm 17,2$ Kcal/dia/Kg; HF com corte CSN antes cirurgia = $274,6 \pm 25,7$ Kcal/dia/Kg; HF com corte CSN após cirurgia = $248,4 \pm 21,3$ Kcal/dia/Kg) (Figura 4.2).

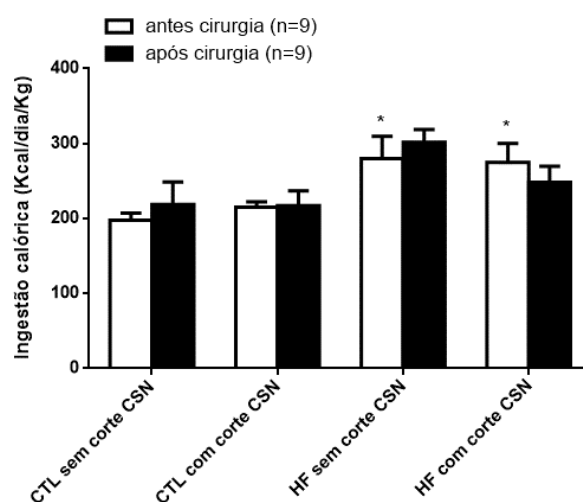


Figura 4.2: Efeito da desnervação bilateral do CSN na ingestão calórica dos animais. As barras representam valores médios \pm SEM. Two-Way ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni: $*p < 0,05$, compara HF com valores controlo.

4.1.3. Efeito da dieta rica em lípidos e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na massa gorda corporal

Numa experiência terminal e após os animais serem sacrificados, o tecido adiposo branco visceral, perirenal, genital, subcutâneo e o WAT circundante BAT, foram recolhidos e pesados, sendo o peso de gordura (g) corrigido para o peso da ratazana (Kg), obtendo-se os resultados expressos na figura 4.3.

Observou-se que a dieta hipercalórica aumenta a quantidade de gordura total nos animais submetidos a uma dieta rica em lípidos (Gordura total CTL 19 semanas dieta = $90,4 \pm 5,3$ g/Kg; Gordura total HF 19 semanas dieta = $199,1 \pm 9,6$ g/Kg). Contudo, a desnervação crónica do CSN diminui significativamente a gordura total dos animais HF em aproximadamente 24% (Figura 4.3 A, Gordura total HF sem corte CSN = $223,4 \pm 2,6$ g/Kg; Gordura total HF com corte CSN = $169,9 \pm 10,4$ g/Kg). Este decréscimo repercutiu-se numa diminuição significativa em todos os tecidos adiposos brancos avaliados, sendo que se observou um decréscimo de aproximadamente: 38% na gordura visceral (Figura 4.3 B, Gordura visceral HF sem corte CSN = $32,1 \pm 2,2$ g/Kg; Gordura visceral HF com corte CSN = $19,9 \pm 2,1$ g/Kg), 18% na gordura perirenal (Figura 4.3 C, Gordura perirenal HF sem corte CSN = $75,2 \pm 2,2$ g/Kg; Gordura perirenal HF com corte CSN = $61,8 \pm 5,4$ g/Kg), 22% na gordura genital (Figura 4.3 D, Gordura genital HF sem corte CSN = $61,6 \pm 2,1$ g/Kg; Gordura genital HF com corte CSN = $47,8 \pm 1,5$ g/Kg), 24% na gordura subcutânea (Figura 4.3 E, Gordura subcutânea HF sem corte CSN = $52,0 \pm 2,8$ g/Kg; Gordura subcutânea HF com corte CSN = $39,5 \pm 2,3$ g/Kg) e ainda, 40% no WAT em torno de BAT (Figura 4.3 F, WAT em torno de BAT HF sem corte CSN = $4,4 \pm 0,3$ g/Kg; WAT em torno de BAT HF com corte CSN = $2,6 \pm 0,4$ g/Kg).

Nos grupos controlo, a desnervação do CSN não alterou significativamente nenhum dos depósitos de gordura analisados (Figura 4.3) (Gordura visceral CTL sem corte CSN = $13,8 \pm 1,6$ g/Kg e Gordura visceral CTL com corte CSN = $11,6 \pm 1,5$ g/Kg; Gordura perirenal CTL sem corte CSN = $29,0 \pm 2,0$ g/Kg e Gordura perirenal CTL com corte CSN = $27,0 \pm 0,9$ g/Kg; Gordura genital CTL sem corte CSN = $29,7 \pm 2,0$ g/Kg e Gordura genital CTL com corte CSN = $25,2 \pm 1,9$ g/Kg; Gordura subcutânea CTL sem corte CSN = $18,4 \pm 1,9$ g/Kg e Gordura subcutânea CTL com corte CSN = $19,1 \pm 1,4$ g/Kg; WAT circundante BAT CTL sem corte CSN = $1,6 \pm 0,2$ g/Kg e WAT circundante BAT CTL com corte CSN = $1,3 \pm 0,1$ g/Kg).

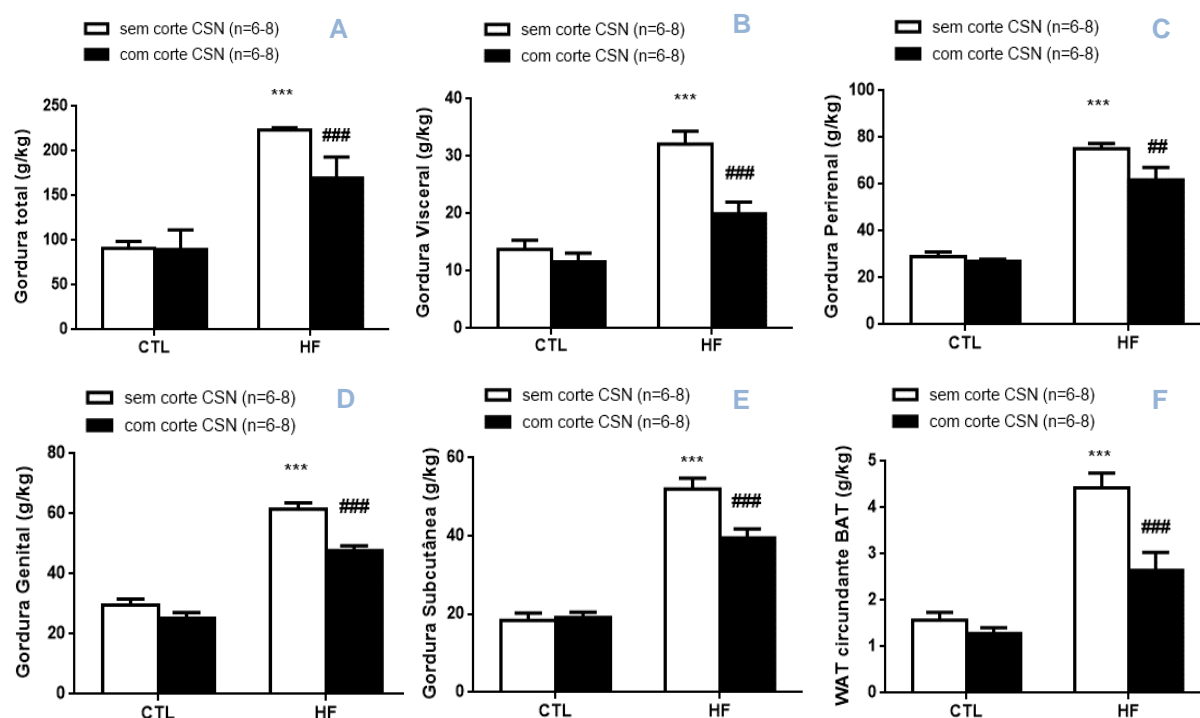


Figura 4.3: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica bilateral do CSN na quantidade de gordura total (A), visceral (B), perirenal (C), genital (D), subcutâneo (E) e ainda, no WAT circundante BAT (F). Os resultados encontram-se expressos em gramas de gordura por peso (Kg) de animal *One* e *Two-Way* ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni: *** $p < 0,001$, compara HF sem corte CSN com valores controlo (A, B, C, D, E, e F); ## $p < 0,01$, compara HF com corte CSN e HF sem corte CSN (C); ### $p < 0,001$, compara HF com e sem corte CSN (A, B, D, E, e F).

4.1.4. Efeitos da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN no BAT

Na figura 4.4, encontra-se representado o efeito da dieta hipercalórica assim como da ablação crónica bilateral do CSN na quantidade de BAT. Esta foi corrigida para o peso do animal.

Observou-se que a dieta hipercalórica não modificou significativamente a quantidade de BAT (BAT CTL = $1,9 \pm 0,2$ g/Kg; BAT HF = $1,7 \pm 0,1$ g/Kg). Observou-se também a ablação do CSN não modificou a quantidade de BAT nos grupos sujeitos à dieta *standard* (BAT CTL sem corte CSN = $2,0 \pm 0,2$ g/Kg; BAT CTL com corte CSN = $1,9 \pm 0,2$ g/Kg), contudo nos animais sujeitos a dieta hipercalórica observou-se um aumento de cerca de 46% com a desnervação do CSN (HF sem corte CSN = $1,7 \pm 0,1$ g/Kg; HF com corte CSN = $2,5 \pm 0,1$ g/Kg).

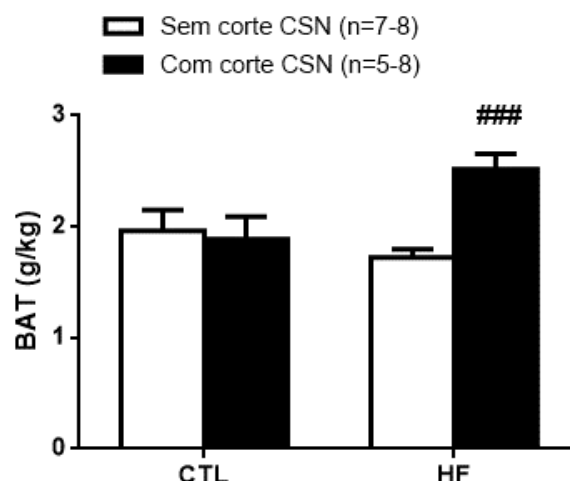


Figura 4.4: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação crónica bilateral do CSN na quantidade de BAT. A quantidade de BAT obtida após sacrifício dos animais foi corrigida para o peso do roedor (g/kg). As barras representam valores médios \pm SEM. *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: ### $p < 0,001$, compara HF com e sem corte do CSN.

4.1.5. Efeitos da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN nos depósitos de lípidos no fígado

Na figura 4.5, encontra-se representado o efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN na deposição de lípidos no fígado.

Observou-se que a dieta hipercalórica aumenta em 136 % a deposição de lípidos no fígado (CTL = $1,6 \pm 0,1$ g; HF = $3,6 \pm 0,1$ g). Nos animais controlo, a desnervação do CSN não modificou os níveis de lípidos no fígado (CTL sem corte CSN = $1,6 \pm 0,1$ g; CTL com corte CSN = $1,5 \pm 0,1$ g), contudo, nos animais sujeitos a dieta HF, a desnervação bilateral do CSN levou uma diminuição de 34% nos depósitos de lípidos no fígado (HF sem corte CSN = $3,6 \pm 0,1$ g; HF com corte CSN = $2,5 \pm 0,1$ g).

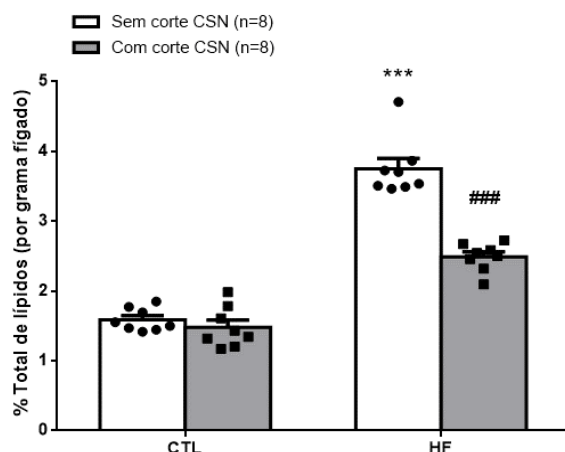


Figura 4.5: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação crónica bilateral do CSN nos depósitos de lípidos no fígado. Para quantificação dos lípidos procedeu-se ao protocolo descrito na secção 3.5. Barras representam valores médios \pm SEM. *One e Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: *** $p < 0,001$, compara HF sem corte CSN com valores controlo; ### $p < 0,001$, compara HF com e sem corte CSN.

4.2. Efeito da dieta rica em lípidos e da deservação bilateral do nervo do seio carotídeo nos parâmetros metabólicos

4.2.1. Efeito da dieta rica em lípidos e do corte bilateral do CSN na glicémia em jejum e na sensibilidade à insulina

Na figura 4.6, encontra-se representado o efeito da dieta rica em lípidos e do corte bilateral do CSN nas glicémias basais após 15 horas de jejum (Figura 4.6 A) e nos valores de sensibilidade à insulina, dados pela constante do teste de tolerância à insulina, K_{ITT} (Figura 4.6 B).

Como se pode observar na figura 4.6A, a dieta hipercalórica aumentou significativamente a glicémia em jejum nos animais HF (glicémia antes dieta = $79,9 \pm 8,0$ mg/dl; glicémia 10 semanas dieta = $96,9 \pm 13,5$ mg/dl; glicémia 19 semanas de dieta = $88,3 \pm 8,4$ mg/dl) em comparação com as glicémias basais dos animais controlo (glicémia antes dieta = $90,4 \pm 14,2$ mg/dl; glicémia 10 semanas dieta = $79,8 \pm 12,5$ mg/dl; glicémia 19 semanas de dieta = $84,06 \pm 10,7$ mg/dl).

A ablação do CSN não modificou a glicémia em jejum do grupo controlo (glicémia CTL com corte CSN antes dieta = $85,7 \pm 5,3$ mg/dl; glicémia CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $85,2 \pm 3,7$ mg/dl) (figura 4.6A). No entanto, nos animais sujeitos à dieta hipercalórica e nos quais a glicémia em jejum tinha aumentado significativamente observou-se uma reversão progressiva ao longo das semanas de avaliações, encontrando-se o valor de glicémia em jejum totalmente restabelecido na nona semana de avaliação (glicémia HF com corte CSN antes dieta = $81,6 \pm 2,1$ mg/dl; glicémia HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $81,5 \pm 2,5$ mg/dl).

Na figura 4.6B, encontra-se representado o efeito da dieta hipercalórica e da ressecção bilateral do CSN na sensibilidade à insulina. Observou-se, tal como seria de esperar, que a dieta hipercalórica diminui significativamente a sensibilidade à insulina (K_{ITT} HF antes da dieta = $4,4 \pm 0,9$ %glucose/min; K_{ITT} HF após 10 semanas de dieta = $1,8 \pm 1,0$ %glucose/min) em comparação com os animais que comeram uma dieta *standard* durante as 10 semanas (K_{ITT} CTL antes da dieta = $4,7 \pm 0,9$ %glucose/min; K_{ITT} CTL após 10 semanas de dieta = $4,4 \pm 0,7$ %glucose/min). A deservação crónica do CSN não afectou a sensibilidade à insulina em animais controlo (K_{ITT} CTL com corte CSN antes da cirurgia = $4,5 \pm 0,3$ %glucose/min; K_{ITT} CTL com corte CSN 9 semanas após ressecção = $4,9 \pm 0,3$ %glucose/min). Pelo contrário, a sensibilidade à insulina foi totalmente restabelecida no modelo HF na primeira semana após corte do CSN (K_{ITT} HF com corte CSN antes da cirurgia = $1,9 \pm 0,4$ %glucose/min; K_{ITT} HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $4,5 \pm 0,3$ %glucose/min), valores esses que se mantiveram até à nona semana após a cirurgia (K_{ITT} HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $4,2 \pm 0,2$ %glucose/min).

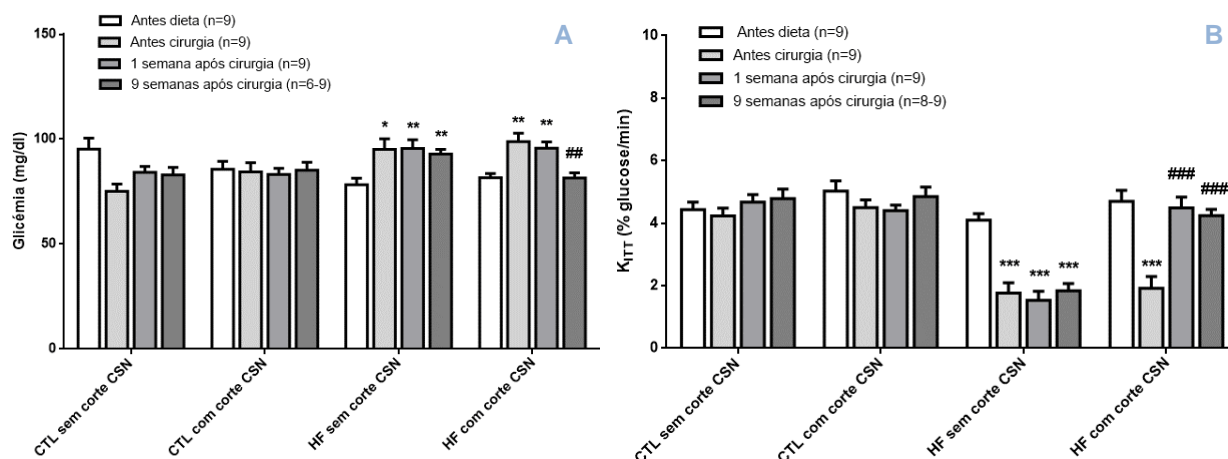


Figura 4.6: Efeito do corte bilateral do nervo do seio carotídeo (CSN) nas glicémias em jejum e na sensibilidade à insulina em grupos submetidos a dieta controlo (CTL) e dieta hipercalórica (HF). **A:** representa as glicémias basais dos roedores antes da dieta, antes da cirurgia de desnervação do CSN e após uma e nove semanas pós-desnervação; **B:** representa a sensibilidade à insulina, determinada através de teste de tolerância à insulina (ITTs) e expressa pela constante de desaparecimento da glucose (K_{ITT}) antes da dieta, antes da cirurgia de desnervação do CSN e após uma e nove semanas pós-desnervação. Barras representam valores médios \pm SEM. *One* e *Two-Way* ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ compara o efeito da dieta na glicémia em jejum e na sensibilidade à insulina; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ compara o efeito da ressecção do CSN na glicémia em jejum e na sensibilidade à insulina.

4.2.2. Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN na tolerância oral à glucose

Nas figuras 4.7 e 4.8, encontra-se representado o efeito da dieta e da ablação bilateral do CSN na tolerância oral à glucose obtida através dos OGTTs, quer nas curvas de excursão da glucose (Figura 4.7), quer nas das AUCs obtidas das curvas de excursão de glucose (Figura 4.8).

Tal como se pode observar na figura 4.7, a tolerância à glucose antes do início das dietas foi semelhante em todos os grupos de animais já que, as curva de excursão de glucose, (Figura 4.7 A) bem como as AUCs (Figura 4.8) são semelhantes entre todos os grupos (AUC CTL antes dieta = $20016,8 \pm 450,4$ mg/dl*min; AUC HF antes dieta = $20572,4 \pm 528,3$ mg/dl*min).

Nos animais submetidos à dieta controlo, não se observaram diferenças significativas nas curvas de excursão de glucose nem nas AUCs ao longo das semanas do protocolo experimental (Figuras 4.7 B,C, D e 4.8) (AUC CTL antes cirurgia = $18299,9 \pm 543,4$ mg/dl*min; AUC CTL 1 semana após cirurgia sham = $19251,5 \pm 250,2$ mg/dl*min; AUC CTL 9 semanas após cirurgia sham = $20390,2 \pm 401,5$ mg/dl*min). Por outro lado, foi possível observar que a dieta hipercalórica alterou a curva de excursão da glucose, bem como as AUCs ao longo das semanas de dieta (Figuras 4.7 B, C, D e 4.8)

(AUC HF 10 semanas dieta = $25387,4 \pm 521,8$ mg/dl*min; AUC HF 19 semanas dieta = $23925,8 \pm 313,9$ mg/dl*min).

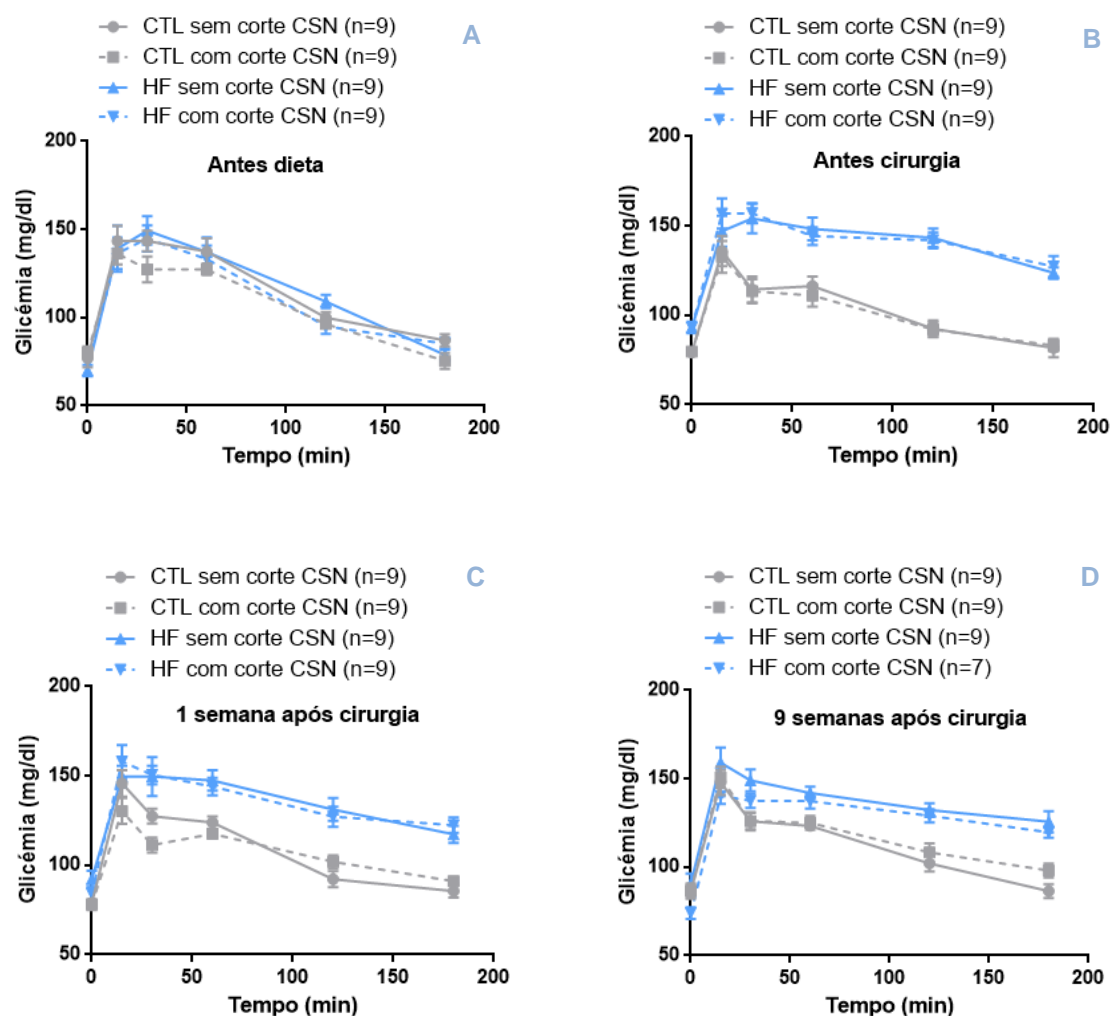


Figura 4.7: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN na tolerância à glucose, representada através das curvas de excursão da glucose obtidas a partir dos teste de tolerância oral à glucose realização dos OGTTs. A, B, C e D: Representam as curvas de excursão da glucose respeitantes aos OGTTs efectuados antes da dieta, antes da cirurgia, 1 semana após cirurgia e 9 semanas após cirurgia, respectivamente. Valores representam médias \pm SEM.

A ablação bilateral do CSN não modificou significativamente a tolerância à glucose em animais controlo (AUC CTL com corte CSN antes cirurgia = $18160,2 \pm 770,5$ mg/dl*min; AUC CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $19181,9 \pm 306,7$ mg/dl*min; AUC CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $20813,5 \pm 662,1$ mg/dl*min), embora uma semana após cirurgia pareça haver uma diminuição entre os 15-30 minutos da curva de excursão de glucose, portanto na parte da curva que representa a secreção de insulina e o início da sua acção. Nos animais submetidos à dieta hipercalórica, observou-se um aumento da tolerância à glucose, que se deve tal como nos animais a uma diminuição entre os 15-30 minutos da curva de excursão de glucose, portanto na parte da curva que representa a secreção de insulina e o início da sua acção controlo. Esta diminuição no pico da curva de excursão de glucose origina consequentemente uma diminuição das AUCs logo na primeira semana após o procedimento cirurgico (Figuras 4.7 C e 4.8) (AUC HF com corte CSN antes da cirurgia = $25415,3 \pm 689,3$ mg/dl*min; AUC HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $22974,5 \pm 790,3$ mg/dl*min), mantendo-se até a nona semana de avaliação (Figuras 4.7 D e 4.8) (AUC HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $23264,3 \pm 433,7$ mg/dl*min).

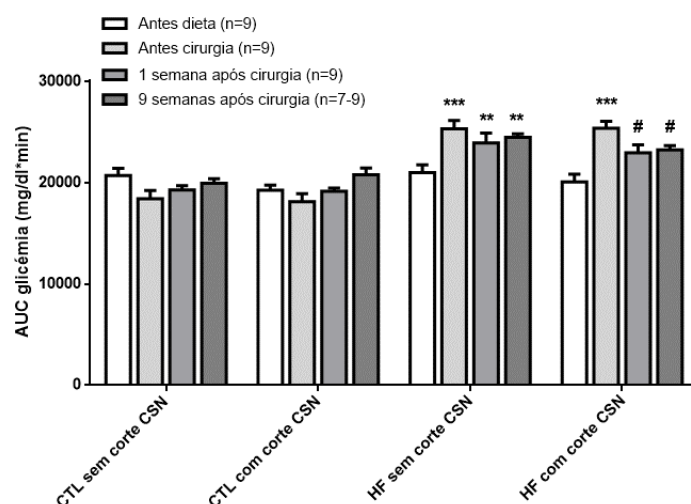


Figura 4.8: Efeito da dieta hipercalórica e da ablação bilateral do CSN na tolerância à glucose, representada como área sobre a curva das curvas de excursão de glucose determinada através de testes de tolerância oral à glucose (OGTTs). Barras representam valores médios \pm SEM. *One* e *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: ** $p < 0,01$, compara HF sem corte do CSN antes da dieta com as semanas 1 e 9 após a cirurgia; *** $p < 0,001$ compara HF sem corte CSN antes da dieta e compara HF com corte CSN antes da dieta com antes da cirurgia; # $p < 0,05$, compara HF com corte CSN antes da dieta com antes da cirurgia e semanas 1 e 9 após cirurgia.

4.2.3. Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN nos níveis de insulina e péptido C

Na figura 4.9, encontra-se representado o efeito da dieta HF e da ablação bilateral do CSN nos níveis de insulina e péptido C no soro obtido através de sangue recolhido aquando a realização de OGTTs. Nos animais submetidos a dieta controlo não se verificaram diferenças significativas na concentração de ambos os marcadores em análise ao longo do tempo, sendo então possível verificar que a desnervação do CSN nestes animais não tem qualquer efeito (**Concentração Insulina** - CTL sem corte antes da cirurgia = $197,5 \pm 44,0$ pmol/l; CTL sem corte CSN 1 semana após cirurgia = $166,1 \pm 35,3$ pmol/l; CTL sem corte CSN 9 semanas após cirurgia = $240,5 \pm 21,9$ pmol/l; CTL com corte antes da cirurgia = $169,6 \pm 40,0$ pmol/l; CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $179,3 \pm 39,4$ pmol/l; CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $227,9 \pm 28,7$ pmol/l (Figura 4.9 A); **Concentração Péptido C** - CTL sem corte antes da cirurgia = $0,7 \pm 0,1$ nmol/l; CTL sem corte CSN 1 semana após cirurgia = $0,7 \pm 0,1$ nmol/l; CTL sem corte CSN 9 semanas após cirurgia = $0,8 \pm 0,1$ nmol/l; CTL com corte antes da cirurgia = $0,7 \pm 0,1$ nmol/l; CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $0,7 \pm 0,1$ nmol/l; CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $0,8 \pm 0,1$ nmol/l) (Figura 4.9 B).

Contudo, a dieta HF aumentou significativamente os níveis de insulina, traduzindo-se num aumento de 128% após 10 semanas de dieta (animais hiperinsulinémicos). Observou-se, ainda, que os níveis de insulina tendem a aumentar com a progressão da doença, tendo em conta os resultados obtidos na 19ª semana de dieta (HF sem corte CSN antes cirurgia = $452,0 \pm 57,8$ pmol/l; HF sem corte 1 semana após cirurgia = $450,1 \pm 60,6$ pmol/l; HF sem corte 9 semanas após cirurgia = $582,8 \pm 85,9$ pmol/l). Por outro lado, a denervação do CSN nos animais sujeitos a dieta HF não restabeleceu a secreção de insulina endógena mas preveniu o seu aumento ao longo das semanas, tendo-se verificado uma maior atenuação logo na primeira semana após cirurgia (HF com corte CSN antes cirurgia = $484,8 \pm 55,4$ pmol/l; HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $413,3 \pm 31,1$ pmol/l; HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $470,1 \pm 37,9$ pmol/l) (Figura 4.9 A).

Visto que os níveis de insulina e péptido C estão relacionados, através da realização do kit foi possível observar também, um aumento de aproximadamente 99% nos níveis de péptido C séricos após 10 semanas de dieta HF. Verificou-se, ainda, uma tendência para um aumento ainda maior dos níveis de péptido C com a progressão da doença nos animais HF sem corte CSN (HF sem corte CSN antes cirurgia = $1,3 \pm 0,1$ nmol/l; HF sem corte CSN 1 semana após cirurgia = $1,4 \pm 0,1$ nmol/l; HF sem corte CSN 9 semanas após cirurgia = $1,8 \pm 0,2$ nmol/l). A desnervação do CSN nos animais sujeitos a dieta HF diminuiu os níveis séricos de péptido C de forma significativa ao longo das semanas, tendo-se observado uma atenuação maior logo na primeira semana após cirurgia (HF com corte CSN antes cirurgia = $1,5 \pm 0,2$ nmol/l; HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $1,2 \pm 0,2$ nmol/l; HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $1,3 \pm 0,2$ nmol/l) (Figura 4.9 B).

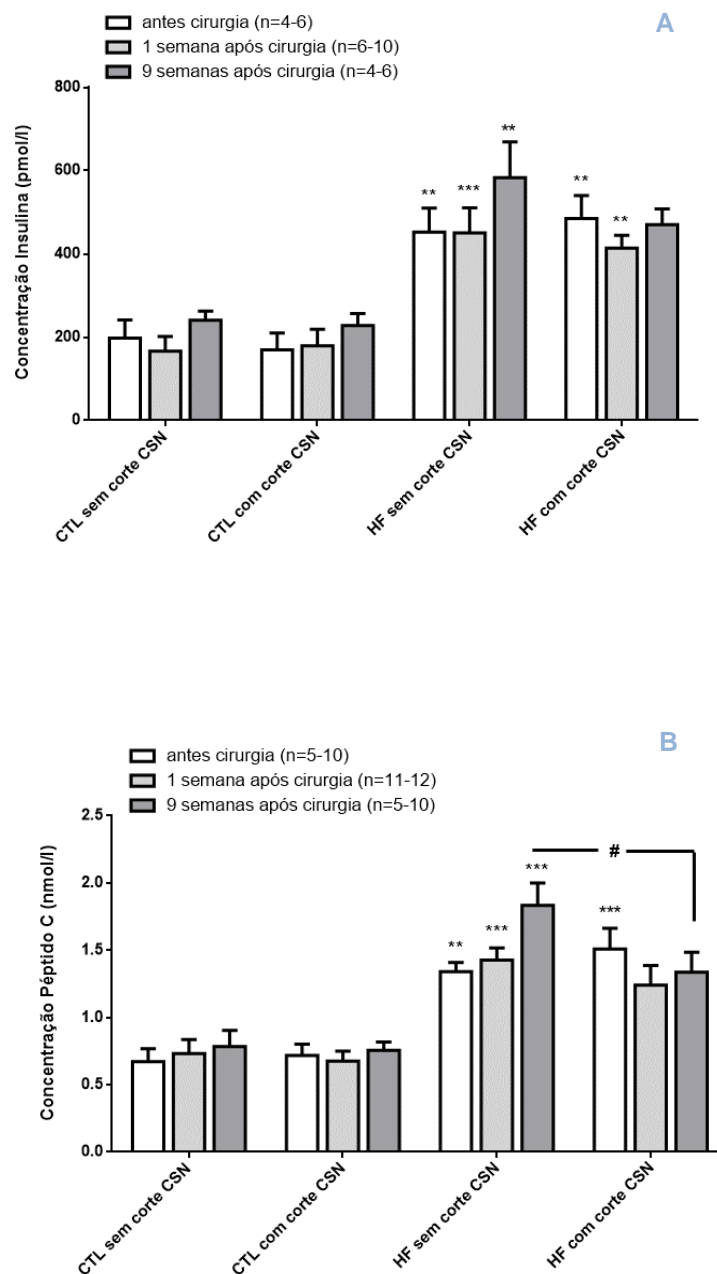


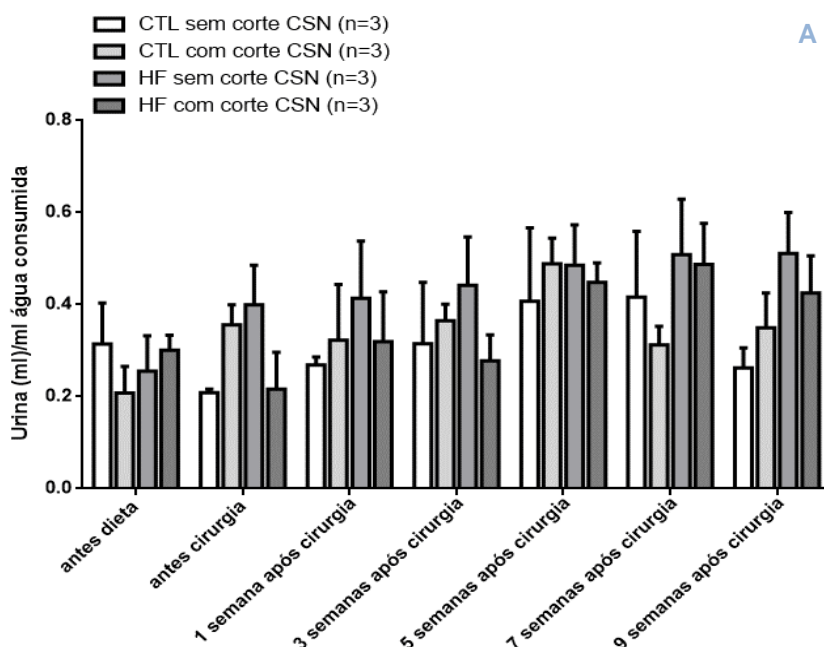
Figura 4.9: Efeito da dieta rica em lípidos e da ablação bilateral do CSN nos níveis de insulina e péptido C do soro. Barras representam valores médios \pm SEM. *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparam HF com valores controlo antes e após cirurgia; # $p < 0,05$ compara HF com corte CSN com HF sem corte CSN após cirurgia.

4.2.4. Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na diurese e na quantidade de fezes

Na figura 4.10, encontra-se representada a quantificação da diurese (Figura 4.10 A) e das fezes (Figura 4.10 B) ao longo das semanas de avaliação. Estes valores foram corrigidos para a água e quantidade de dieta consumidas (diurese e fezes, respectivamente) no período de avaliação.

Relativamente à diurese, não se verificaram diferenças significativas ao longo das semanas quer nos modelos sujeitos a dieta *standard* quer nos modelos HF, sugerindo que a desnervação do CSN não afecta a quantidade de urina (Valores médios de todas as semanas de avaliação – CTL sem corte CSN = $0,3 \pm 0,2$ ml/ml água consumida; CTL com corte CSN = $0,3 \pm 0,1$ ml/ml água consumida; HF sem corte CSN = $0,4 \pm 0,2$ ml/ml água consumida; HF com corte CSN = $0,4 \pm 0,1$ ml/ml água consumida) (Figura 4.10 A).

Tendo em conta os resultados obtidos para a quantificação das fezes, verificou-se que o tipo de dieta a que os animais estão sujeitos tem repercussões na quantidade de fezes produzida, dado que o modelo obeso apresenta valores de defecação menores do que os animais controlo, possivelmente devido à diferença na quantidade de fibra existente na composição das dietas (dieta controlo 17,1% de fibra e dieta HF 6,5% de fibra). Contudo, a desnervação bilateral do CSN não aparenta ter qualquer efeito nestes valores (Valores médios de todas as semanas de avaliação – CTL sem corte CSN = $0,4 \pm 0,1$ g/g dieta consumida; CTL com corte CSN = $0,4 \pm 0,1$ g/g dieta consumida; HF sem corte CSN = $0,2 \pm 0,1$ g/g dieta consumida; $0,1 \pm 0,1$ g/g dieta consumida) (Figura 4.10 B).



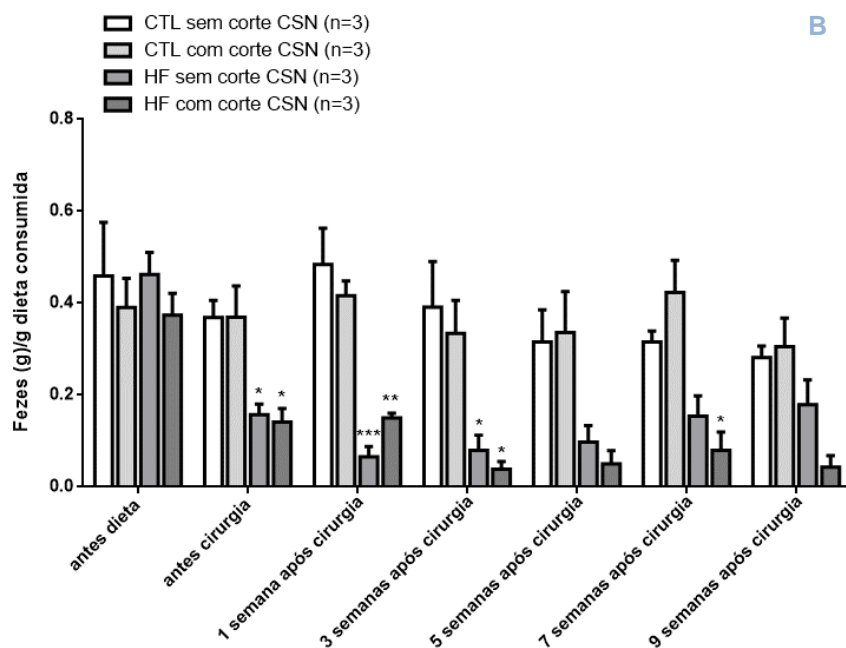


Figura 4.10: Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na diurese e na quantidade de fezes. Barras representam valores médios \pm SEM. *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparam a quantidade de fezes produzida nos HF com valores controlo antes e após cirurgia.

4.3. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo na ventilação basal e respostas à hipóxia e hipercapnia

4.3.1. Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN na ventilação basal

Na figura 4.11, encontra-se representado o efeito da desnervação do CSN na ventilação basal, expressa como volume minuto (MV). A semana 0, na figura 4.11, representa valores de ventilação antes da cirurgia. Como se pode observar a dieta hipercalórica não modificou significativamente a ventilação basal (MV CTL antes da cirurgia = $307,6 \pm 19,5$ ml/min/Kg; MV HF antes da cirurgia = $299,9 \pm 18,2$ ml/min/Kg).

A ablação bilateral do CSN não modificou significativamente a ventilação basal em animais controlo (CTL antes cirurgia = $307,6 \pm 19,5$ ml/min/Kg; CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $387,1 \pm 32,6$ ml/min/Kg; CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $355,5 \pm 70,4$ ml/min/Kg), nem em animais HF. Contudo através da análise dos valores podemos observar que existe uma tendência para a diminuição do volume corrente com a desnervação do CSN 1 semana após a cirurgia (Valor de $P = 0,08$), que é compensada nas restantes semanas após a ablação (HF antes cirurgia = $299,9 \pm 18,2$ ml/min/Kg; HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $268,6 \pm 34,1$ ml/min/Kg; HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $309,9 \pm 27,9$ ml/min/Kg).

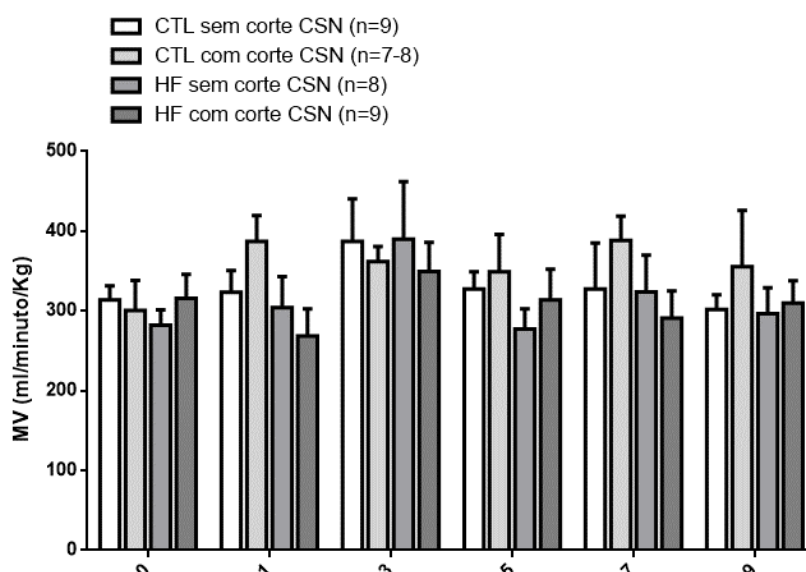


Figura 4.11: Efeito da dieta hipercalórica e da desnervação do CSN na ventilação basal, medida como volume minuto. O volume minuto foi obtido através do produto entre a frequência respiratória e o volume corrente e corrigido para o peso dos animais (Kg). Barras representam valores médios \pm SEM.

4.3.2. Efeito da dieta hipercalórica e da deservação do CSN nas respostas ventilatórias à hipóxia e à hipercapnia

Na figura 4.12, encontra-se representado o efeito da hipóxia (10,0% O₂) (Figura 4.12 A) e da hipercapnia (5,0% CO₂) (Figura 4.12 B) na ventilação expressa como % de efeito sobre o período normóxico (21,0% O₂) imediatamente anterior à aplicação do estímulo.

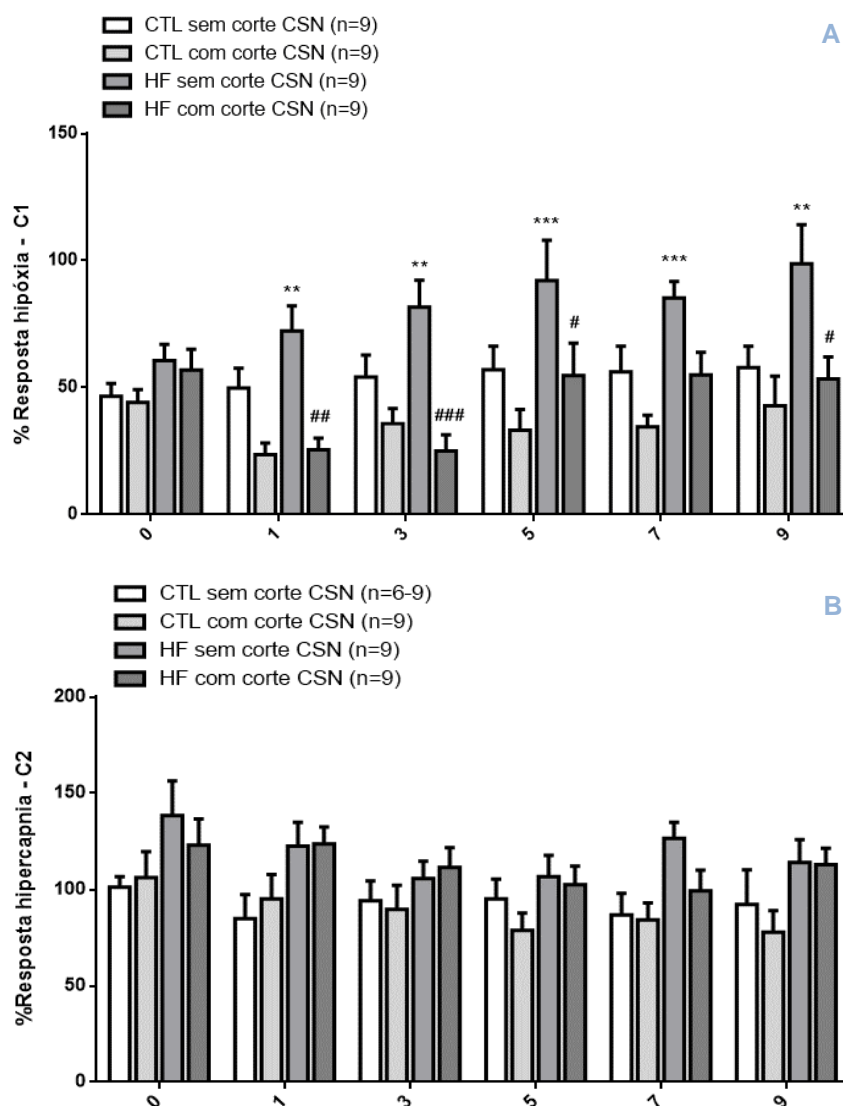


Figura 4.12: Efeito da dieta hipercalórica e da deservação bilateral do CSN nas respostas ventilatórias à hipóxia (A) e à hipercapnia (B). **A:** percentagem de aumento no volume minuto em resposta à hipóxia (10,0% O₂) comparativamente com o período de normóxia (21% O₂) imediatamente anterior (C1), antes da cirurgia e nas semanas 1,3,5,7 e 9 pós-cirurgia; **B:** percentagem de aumento no volume minuto em resposta à hipercapnia (5,0% CO₂) comparativamente com o período de normóxia (21% O₂) imediatamente antes (C2), antes da cirurgia e nas semanas 1,3,5,7 e 9 pós-cirurgia. Para detalhes do protocolo ver Figura 3.5. Barras representam valores médios \pm SEM. *Two-Way ANOVA* com teste de múltipla comparação de Bonferroni: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparam HF sem corte CSN ao longo das semanas de avaliação após cirurgia com valores controlo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparam HF sem corte CSN com HF com corte CSN ao longo das semanas de avaliação após cirurgia.

Tal como se pode observar na semana 0, e de acordo com o descrito anteriormente por Ribeiro et al., 2013, antes da cirurgia, e após 10 semanas de dieta hipercalórica, os animais HF apresentam uma maior resposta à hipóxia que os animais controlo (% aumento MV hipoxia CTL = $45,3 \pm 14,8$; % aumento MV hipoxia HF = $58,6 \pm 23,8$), representando um aumento de aproximadamente 29%. Observou-se também que este aumento na resposta à hipóxia nos animais HF acentua-se com a progressão da doença, já que existe um aumento progressivo dos valores de resposta à hipoxia nas semanas 11, 13, 15, 17 e 19 pós- início da dieta hipercalórica nos HF sem corte do CSN (HF sem corte CSN 1 semana após cirurgia = $72,3 \pm 9,9$ %; HF sem corte CSN 3 semanas após cirurgia = $81,7 \pm 10,5$ %; HF sem corte CSN 5 semanas após cirurgia = $92,1 \pm 15,9$ %; HF sem corte CSN 7 semanas após cirurgia = $85,2 \pm 6,6$ %; HF sem corte CSN 9 semanas após cirurgia = $98,7 \pm 15,5$ %) (figura 4.12 A).

Dado que o CB é um quimiorreceptor periférico, sendo o principal sensor que detecta a diminuição de O_2 (hipóxia), seria de esperar uma diminuição das respostas à hipóxia em animais com o CSN desnervado. De facto, pode-se notar que a desnervação do CSN diminui de uma maneira significativa o aumento de ventilação produzido pela hipóxia quer nos animais controlo quer nos animais HF (CTL com corte CSN antes cirurgia = $44,2 \pm 5,1$ %; CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $23,6 \pm 4,5$ % e HF com corte CSN antes cirurgia = $56,8 \pm 8,3$ %; HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $25,5 \pm 4,5$ %). (figura 4.12 A). Esta diminuição acentuada da resposta à hipóxia comprova a correcta desnervação do CSN quer nos animais controlo quer nos HF. Para além disso na figura 4.12A podemos observar que o efeito da desnervação do CSN no aumento da ventilação em resposta à hipóxia vai diminuindo ao longo do tempo (CTL com corte CSN 1 semana após cirurgia = $23,6 \pm 4,5$ %; CTL com corte CSN 3 semanas após cirurgia = $35,7 \pm 6,0$ %; CTL com corte CSN 5 semanas após cirurgia = $33,2 \pm 8,2$ %; CTL com corte CSN 7 semanas após cirurgia = $34,5 \pm 4,6$ %; CTL com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $42,8 \pm 11,7$ %; HF com corte CSN 1 semana após cirurgia = $25,5 \pm 4,5$ %; HF com corte CSN 3 semanas após cirurgia = $24,9 \pm 6,4$ %; HF com corte CSN 5 semanas após cirurgia = $54,7 \pm 12,7$ %; HF com corte CSN 7 semanas após cirurgia = $55,0 \pm 8,9$ %; HF com corte CSN 9 semanas após cirurgia = $53,4 \pm 8,7$ %) o que sugere uma compensação da falta de resposta à hipóxia pelo sistema nervoso central.

Em relação à resposta à hipercapnia, não se observaram diferenças estatisticamente significativas quer entre animais controlo e animais HF ao longo do período estudado, e também não se observou qualquer efeito da desnervação do CSN nestas respostas. Estes resultados são expectáveis já que a resposta ventilatória à hipercapnia é maioritariamente mediada pelo sistema nervoso central e como tal não é previsto visualizarem-se diferenças significativas ao longo das semanas de avaliação, tal como se pode observar na figura 4.12 B.

4.4. Efeito da dieta rica em lípidos e da desnervação bilateral do nervo do seio carotídeo nos parâmetros hemodinâmicos

A obesidade é um dos principais factores que contribui para o desenvolvimento de hipertensão arterial (Katagiri et al., 2007), assim resolveu-se avaliar a pressão arterial nos diferentes grupos de animais na experiência terminal antes do sacrifício dos mesmos (Figura 4.13).

Tal como se pode observar na figura, a dieta rica em lípidos levou ao aumento das pressões arteriais sistólica (SBP) e diastólica (DBP) nos roedores sujeitos a dieta hipercalórica, o que se reflectiu também no valor de pressão arterial média (MBP CTL sem corte CSN = $95,4 \pm 6,8$ mmHg; MBP HF sem corte CSN = $127,8 \pm 6,8$ mmHg). A desnervação do CSN não modificou significativamente os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média nos animais CTL (MBP CTL com corte CSN = $104,1 \pm 1,9$ mmHg), mas normalizou para valores controlo os valores de pressão arterial nos animais HF (MBP HF com corte CSN = $100,0 \pm 8,7$ mmHg).

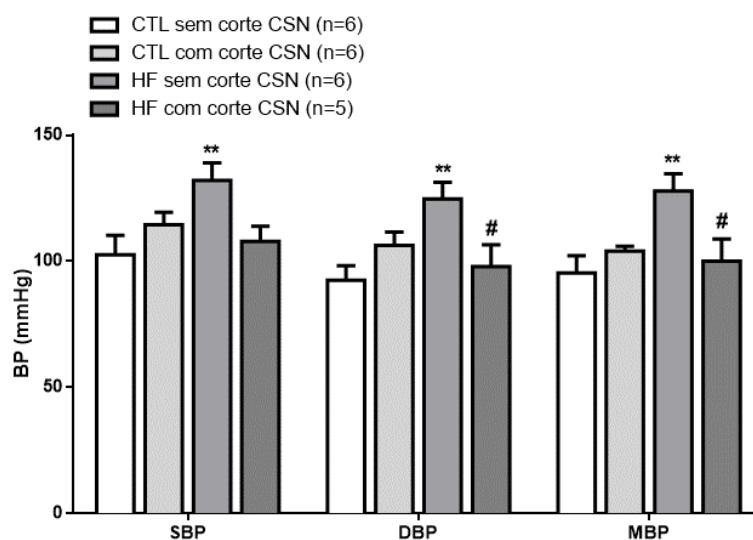


Figura 4.13: Efeito da dieta hipercalórica e do corte bilateral do CSN na pressão arterial sistólica, diastólica e média. Barras representam valores médios \pm SEM. BP: pressão arterial; SBP: pressão arterial sistólica; DBP: pressão arterial diastólica; MBP: pressão arterial média. One e Two-Way ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni: ** $p < 0,01$, compara os HF sem corte CSN com valores controlo; # $p < 0,05$, compara HF com corte CSN com HF sem corte CSN.

Na figura 4.14, encontra-se representado o efeito da dieta hiperlipídica e da ressecção bilateral do CSN na concentração de NO plasmático. Observou-se que a dieta HF aumento em cerca de 29% o NO plasmático. A ressecção do CSN diminuiu de uma maneira não significativa as concentrações de NO nos grupos sujeitos à dieta *standard* (CTL sem corte CSN = $24,0 \pm 3,5 \mu\text{M}$; CTL com corte CSN = $19,6 \pm 5,3 \mu\text{M}$). Contudo a ressecção bilateral do CSN em animais HF diminuiu para valores similares aos valores controlo a quantidade de NO (HF sem corte CSN = $30,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$; HF com corte CSN = $25,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$).

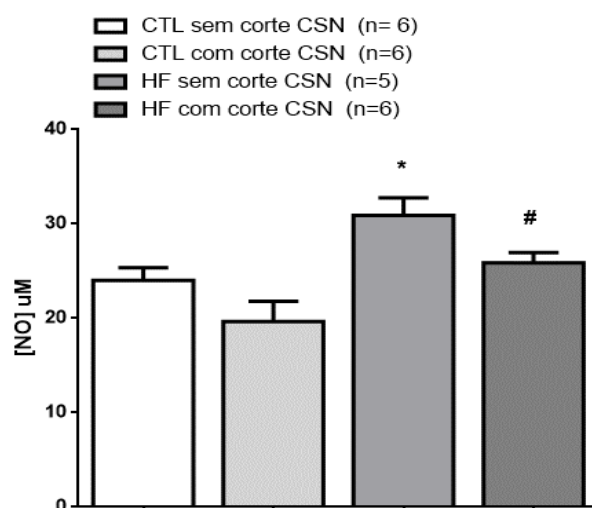


Figura 4.14: Efeito da dieta hiperlipídica e da ressecção bilateral do CSN na concentração de NO plasmática. Barras representam valores médios \pm SEM. One-Way ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni: * $p < 0,05$, compara HF sem CSN com valores controlo; # $p < 0,05$, compara HF com corte CSN com HF sem corte CSN.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstrou-se pela primeira vez que o CB parece ter um papel no desenvolvimento da obesidade já que a modulação da actividade deste órgão, através da ablação bilateral crónica do CSN diminuiu o ganho de peso, a massa gorda corporal e a deposição de lípidos no fígado em roedores sujeitos a uma dieta rica em lípidos. Para além disso, a ressecção bilateral do CSN restaurou a sensibilidade à insulina e produziu uma melhoria na tolerância à glucose assim como na secreção de insulina no modelo de obesidade estudado no presente trabalho. Observou-se também que a ressecção crónica do CSN reverte a hipertensão produzida pela obesidade assim como os valores de NO plasmático.

Efeito da ressecção do CSN no ganho de peso, massa corporal e fígado gordo

No presente trabalho observou-se que 19 semanas de dieta rica em lípidos (60%) foi suficiente para obter um aumento de peso e massa gorda corporal nos animais sujeitos a dieta HF. Estes resultados eram expectáveis já que anteriormente, no nosso laboratório, foi observado que 3 semanas de dieta rica em 45% de lípidos produziam um aumento do peso corporal (Ribeiro et al., 2013), não sendo, no entanto, este da mesma magnitude do que o que se observa no presente estudo. Num estudo já realizado com o mesmo modelo animal (Nascimento et al., 2008), as ratazanas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, tendo sido um dos grupos submetido a uma dieta controlo (3,5 Kcal/g) e o outro a dieta hipercalórica (4,6 Kcal/g), por um período de 14 semanas. Nesse trabalho, os investigadores observaram um aumento de peso e massa gorda corporal nos animais sujeitos à dieta hipercalórica, corroborando, assim, os resultados obtidos no presente estudo. Também num estudo realizado mais recentemente (Olea et al., 2014) em ratazanas *Wistar*, observou-se que animais submetidos a dieta HF (5,2 Kcal/g com 60% de energia sob a forma de gordura) durante 12 semanas, apresentavam um aumento considerável de peso e depósitos de gordura.

Estudos anteriores realizados neste laboratório demonstraram que a ressecção crónica do CSN prevenia o ganho de peso em animais submetidos a uma dieta rica em 45% de lípidos (Ribeiro et al., 2013). No presente trabalho, demonstrou-se que a ressecção crónica bilateral do CSN levou a uma diminuição do ganho de peso dos animais HF, assim como a uma diminuição da massa de gordura total, devido ao decréscimo de todos os tipos de depósitos de gordura analisados (visceral, perirenal, genital, subcutânea e WAT em torno de BAT). Estes resultados estão alinhados com os estudos prévios e parecem importantes do ponto de vista clínico, dado que a diminuição de ganho de peso e da massa gorda corporal apresentada nos animais HF com corte bilateral do CSN é significativamente relevante quando comparada com as terapêuticas anti-obesidade existentes actualmente no mercado (para consulta ver Tabela 1.3, secção 1.2). Esta diminuição do ganho de peso e da massa gorda nos animais referidos, não parece provir da diminuição da ingestão calórica após a cirurgia, já que não houve qualquer alteração na quantidade de calorias ingeridas (Figura 4.2). Da mesma forma, esta também não parece ocorrer devido à diminuição do trânsito gastro-intestinal, já que não se observaram

quaisquer diferenças entre os animais HF *sham* e os animais HF com desnervação bilateral do CSN (Figura 4.10 B).

No presente trabalho observou-se também que os animais HF com corte do CSN exibiam um aumento significativo na quantidade de BAT. Este facto pode estar implicado na diminuição de ganho de peso e massa gorda corporal, já que se sabe que o BAT é um tecido termogénico e com uma capacidade metabólica acrescida, quer devido ao elevado número de mitocôndrias existente neste tecido quer ao aumento da actividade destas mitocôndrias, que normalmente é visível através da maior actividade da UCP1. O aumento de BAT, também poderá ser explicado pelo fenómeno de “*Browning*”. Este processo poderá ter ocorrido no WAT circundante ao BAT, daí também se ter observado uma diminuição da quantidade de tecido adiposo branco que circunda o BAT nos animais HF com ablação bilateral do CSN (Figura 4.3 F). Vários são os estudos que enumeram os diferentes tipos de estímulos para a ocorrência deste fenómeno. Por exemplo, Fisher e a sua equipa (Fisher et al., 2012), já sabiam que o factor de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), aumentava o gasto de energia e era expresso no BAT quando este era estimulado pelo frio e demonstraram que o tratamento com FGF21 tinha um papel importante no aumento da transcrição de genes termogénicos, aumentando a expressão de UCP1 no BAT e o fenómeno de “*Browning*” em WAT subcutâneo. Além disso, também demonstraram a função de FGF21 na adaptação celular e molecular do tecido adiposo à exposição ao frio. Tal como este estudo, existem muitos outros estímulos que induzem o “*Browning*”, que para uma consulta mais rápida, podem ser consultados em artigos de revisão (Bartelt e Heeren, 2013; Bonet et al., 2013; Thyagarajan e Foster, 2017).

Da mesma forma, a modulação da actividade do CB, através da desnervação crónica do CSN, possivelmente via modulação do SNS, poderá ser mais um estímulo que despoleta o fenómeno de “*Browning*”. Contudo, para avaliar a hipótese proposta pelo nosso grupo, terão de ser realizados western-blot ou técnicas de imunohistoquímica para avaliar a expressão da UCP1, *MitoTracker* para avaliar a quantidade de mitocôndrias e, complementarmente, poderá ser determinada a concentração de citocromo C oxidase em WAT de desnervados e não desnervados para aferir a actividade mitocondrial e estudar a capacidade termogénica do tecido. Para além disso, para investigar se isto se deve a uma modulação via SNS, poderíamos fazer registos electrofisiológicos da actividade dos nervos simpáticos que enervam o BAT tal como avaliar a expressão de receptores adrenérgicos.

No presente trabalho observou-se também que a obesidade induzida pela dieta HF aumenta a deposição de lípidos no fígado. O método utilizado neste estudo para a extracção de lípidos do fígado (Clorofórmio:Metanol) já foi usado em trabalhos anteriores nos quais os animais também tinham sido sujeitos a dietas HF (Sreenan et al., 1999; Forcheron et al., 2009; Torres-Villalobos et al., 2016). De facto, em Torres-Villalobos 2016, ratos *Wistar* machos, com 8 semanas de idade, foram alimentados com dieta hipercalórica (18,7% proteína + 45% gordura + 36,4% hidratos de carbono) ou com dieta rica em hidratos de carbono (28,5% proteína + 13,5% gordura + 57,9% hidratos de carbono e 20% de sacarose na água) durante 180 dias. Observaram que grupos *sham* sujeitos a estas dietas

apresentavam quantidades elevadas de triglicéridos e colesterol hepáticos. Ainda, na tese de doutoramento de Elena Olea (Olea, 2016), foi inferido este aumento de conteúdo de lípidos totais no fígado em animais sujeitos a dieta HF comparativamente com os valores controlo. Contudo, tanto as ratazanas *Wistar* controlo como as HF desse estudo, apresentaram percentagens de deposição de lípidos no fígado superiores às obtidas neste trabalho (CTL: $4,5 \pm 0,07$; HF: $9,94 \pm 0,7$). Provavelmente este facto dever-se-á às diferenças na constituição das dietas utilizadas nos estudos (dietas utilizadas no estudo de Olea 2016 – CTL: 3,8 Kcal/g com 10% de gordura; HF: 5,2 Kcal com 60% de gordura) e à duração do período em que estes animais foram sujeitos à dieta (12 semanas).

No presente estudo, demonstrou-se pela primeira vez, que a ablação bilateral crónica do CSN em animais HF, reduz de forma significativa a percentagem total de lípidos hepáticos. Estes resultados estão de acordo também com os obtidos num estudo que decorreu em paralelo no nosso laboratório num modelo genético de obesidade, o *Zucker Diabetic Fatty*, devido à ausência de receptores de leptina funcionais.

Efeito da ressecção crónica do CSN nas comorbilidades: insulino-resistência e tolerância à glucose

No presente estudo observou-se que a dieta hipercalórica que se administrou aos animais e que continha 60% de lípidos aumentou as glicémias em jejum. Estes resultados estão de acordo com resultados publicados anteriormente por (Kamgang et al., 2005), nos quais se observou que ratazanas *Wistar* sujeitas por um período de 4 meses a uma dieta rica em sacarose (65-70% hidratos de carbono + 25-30% gordura + 10-15% proteína) ou a uma dieta rica em lípidos (35-40% hidratos de carbono + 50-55% gordura + 10-15% proteína) desenvolviam um aumento significativo da glicémia em jejum. Anteriormente, no nosso laboratório não observámos um aumento da glicémia em jejum em animais submetidos a uma dieta rica em lípidos, no entanto o período de dieta anteriormente testado foi de 3 e 6 semanas (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017) e não as 19 semanas testadas no presente trabalho. Observou-se também como descrito anteriormente por nós e por outros grupos de investigadores (Nascimento et al., 2008; Conde et al., 2012; Ribeiro et al., 2013; Olea et al., 2014) que a administração de uma dieta rica em lípidos produz resistência à insulina.

A ablação bilateral do CSN foi capaz de reverter o aumento na glicémia em jejum observado nos animais HF, contudo esta reversão para valores controlo só se observou 9 semanas pós-ressecção do CSN. Contrariamente, a reversão da insulino-resistência nos animais HF submetidos à desnervação do CSN, verificou-se logo uma semana após a ressecção do nervo. A reversão da insulino-resistência com a ressecção do CSN não é novidade já que anteriormente se tinha descrito em modelos de síndrome metabólico (Ribeiro et al., 2013). Contudo, neste caso não se tinha observado reversão da hiperglicemia já que o modelo HF utilizado nesse estudo não tinha aumento da glicémia em jejum.

Um dos mecanismos que pode estar na base do restabelecimento da sensibilidade à insulina nos animais HF com a ablação bilateral do CSN poderá ser a recuperação das vias de sinalização da insulina. Vários autores já relataram uma diminuição da expressão do receptor de insulina em estados resistentes à insulina (Iwashita et al., 2002; Sacramento et al., 2017). Foi previamente observado por

Sacramento et al., 2017, que no músculo-esquelético os níveis do receptor de insulina eram completamente restaurados em animais HSu e HF após 3 semanas do corte bilateral do CSN e, ainda, que a actividade deste receptor não só foi restaurada como aumentou nestes animais, bem como nos animais controlo desnervados. Da mesma forma, observaram também que no tecido adiposo, com a desnervação bilateral crónica do CSN, os níveis de receptor de insulina tinham sido completamente recuperados em animais HSu. Porém, em animais HF apenas observaram uma tendência para o aumento deste receptor. Apesar disso, a sua actividade foi restaurada em ambos os modelos. No fígado não verificaram quaisquer alterações quer nos níveis quer na actividade do receptor da insulina nem com a dieta nem com o corte bilateral do CSN. Assim sendo, seria interessante avaliar a expressão deste receptor nos tecidos sensíveis à insulina, nomeadamente no tecido adiposo, no fígado, assim como no músculo-esquelético. Porém, no decorrer deste período de tese de mestrado não houve tempo suficiente para avaliar esta hipótese. As alterações na expressão de proteínas envolvidas nesta via teriam de ser avaliadas através de Western blots. Para além disso, e sabendo que a via do receptor da insulina culmina na captação de glucose, seria interessante avaliar o *uptake* de glucose nos animais com e sem ressecção do CSN, principalmente ao nível do tecido adiposo e do BAT. Isto porque observamos que os HF com ablação bilateral do CSN possuíam uma maior quantidade de BAT (Figura 4.4) e seria necessário averiguar se para além do aumento da sensibilidade à insulina também ocorria uma maior captação da glucose neste tecido.

No presente trabalho observámos, também, que a dieta rica em lípidos induz intolerância à glucose, que nos é dada por um aumento do pico nas concentrações de glucose nas curvas de excursão da mesma, o que reflecte alterações na secreção de insulina, assim como no tempo de excursão de glucose. Estes dois factores consequentemente aumentaram as AUCs nos animais HF. Estes resultados estão de acordo com obtidos em 1996 por Akiyama (Akiyama et al., 1996) e pela sua equipa. Nesse projecto, ratas *Wistar* adultas foram submetidas a uma dieta hipercalórica (360 Kcal / Kg de peso corporal / dia) ou a uma dieta controlo (180 Kcal / Kg de peso corporal / dia). Observaram, então, que os animais submetidos a uma dieta hipercalórica eram intolerantes à glucose. De igual forma, no estudo realizado no nosso laboratório e publicado em 2017 (Sacramento et al., 2017) observámos que ratos submetidos a uma dieta rica em lípidos eram intolerantes à glucose após 6 semanas de dieta rica em lípidos.

Tal como foi observado, também no estudo por nós publicado em 2017, a ablação bilateral do CSN produziu uma diminuição do tempo de excursão de glucose e consequente diminuição de AUCs nos animais obesos (Sacramento et al., 2017). No entanto no estudo de Sacramento et al., 2017, a tolerância à glucose foi estudada a partir da realização de testes de tolerância à glucose intravenosa (IVGTT), com 2-desoxi [3H] glucose, em ratos *Wistar* que tinham sido submetidos a dieta HF (45% gordura + 35% hidratos de carbono + 20% proteína) durante 21 dias.

Foi, ainda, observado nesse mesmo estudo (Sacramento et al., 2017), que a ablação unilateral do CSN é compensada pelo outro CB, dado que a resistência à insulina após-desnervação unilateral do CSN é revertida uma semana após o corte do nervo. No entanto, ao fim de duas semanas, os

animais voltam a expressar resistência à insulina, contrariando o efeito benéfico da desnervação, não sendo eficaz sobre a acção da insulina e o metabolismo da glucose.

No presente trabalho foram ainda avaliadas as concentrações séricas de insulina e péptido C, de modo a avaliar o efeito da dieta rica em lípidos e da ressecção do nervo do seio carotídeo sobre a secreção de insulina. De facto, a quantificação do péptido C é uma medição da libertação endógena de insulina. Tendo em conta que as concentrações de insulina e péptido C aumentam com o crescimento do animal, optou-se por realizar os kits apenas com amostras correspondentes à 10^a semana de dieta e 1^a e 9^a semanas após a cirurgia, não lendo as amostras referentes ao soro recolhido antes da submissão da dieta, uma vez que os animais no início do estudo só tinham 9 semanas de idade, as concentrações de insulina e péptido C seriam muito baixas. Num estudo realizado por Guarino e a sua equipa (Guarino et al., 2013), onde usaram como modelo animal ratas *Wistar* com 3, 12 e 24 meses de idade, observaram que as concentrações de insulina aumentavam com a idade dos animais. De facto, no presente trabalho verificou-se que a dieta HF aumenta a concentração destes marcadores no soro dos animais, o que era expectável de acordo com estudos realizados anteriormente (Olea et al., 2014; Gao et al., 2015; Sacramento et al., 2017). Em Gao et al., 2015, mostraram que a hiperinsulinemia era induzida pela dieta HF (60% gorduras + 20% de hidratos de carbono + 20% de proteínas) e que esta aumentava ao longo das semanas (concentrações avaliadas nas semanas 0,4, 8 e 12 de dieta) em ratinhos CD-1 fêmeas estiveram sujeitos à mesma.

Observou-se ainda, que com a desnervação do CSN os níveis de insulina e péptido C séricos dos animais sujeitos a dieta HF tendem a diminuir, contudo não são restabelecidos para valores controlo, contrariamente aos estudos realizados anteriormente no nosso laboratório (Ribeiro et al., 2013). Tal pode dever-se ao facto da composição das dietas dos modelos HF usadas nestes estudos ser ligeiramente diferente (presente estudo: 18,1 % proteína + 61,6% gordura + 20,3 % hidratos de carbono e estudo anterior: 20% proteína + 45% gordura + 35 % hidratos de carbono) bem como o período de submissão à dieta HF no presente trabalho ser mais longo do que no estudo anterior, quer antes quer após cirurgia. Esta tendência de atenuação dos níveis de insulina e péptido C séricos poderá dever-se a uma melhoria da via de sinalização de insulina, mas uma vez mais, esta hipótese teria de ser testada através da realização de Western blots como já referido anteriormente.

Efeito da ressecção crónica do CSN nas comorbilidades: hipertensão

Sabe-se que a obesidade é um dos factores responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão (Rahmouni et al., 2005; Francischetti e Genelhu, 2007; Patschan e Scholze, 2007) e que a dieta rica em lípidos em roedores induz esta comorbilidade (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017). O aumento da pressão arterial média induzido pela dieta hipercalórica já tinha sido anteriormente demonstrado por vários autores (Verwaerde et al., 1996; Chung et al., 2010; Chaar et al., 2016). Para elucidar os mecanismos fisiopatológicos que ligam a obesidade – hipertensão-resistência à insulina, Verwaerde e a sua equipa (Verwaerde et al., 1996), desenvolveram um modelo experimental que reproduzia as três anomalias referidas (obesidade, hipertensão e insulino-resistência) em simultâneo. Para tal, submeteram cães *Beagle-Harrier* machos a 7 semanas de dietas hipercalórica e hiperlipídica e avaliaram, entre outros factores, a pressão arterial sistémica antes e após o período de dieta. Associaram então, tal como descrito no início deste parágrafo, a obesidade abdominal induzida pela dieta hipercalórica ao aparecimento de hipertensão sistémica.

No presente trabalho observou-se, também, que a desnervação crónica do CSN normaliza a pressão arterial para valores controlo, tal como já tinha sido descrito anteriormente (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2017). O CB para além de ser um órgão quimiorreceptor, transmite também informações de barorreceptor. Assim sendo, surgem preocupações relacionadas com a estabilidade da pressão arterial com o corte do CSN. Está bem documentado que a ressecção dos barorreceptores pode causar flutuações de curto prazo na pressão sanguínea, uma vez que os barorreceptores desempenham um papel importante na regulação desta a curto prazo (Cowley et al., 1973; Norman et al., 1981). Estas flutuações a curto prazo podem ser compensadas a longo prazo (Norman et al., 1981; Irigoyen et al., 1995), pelo sistema nervoso central, por mecanismos de ajuste de volume de líquido renal (Cowley et al., 1973) ou ainda pelos corpos aórticos, como evidenciado em estudos recentes que mostraram que o barorreflexo arterial é um regulador da pressão arterial a longo prazo (Lohmeier et al., 2003; Lohmeier e Iliescu, 2015). Esses ajustes de longo prazo podem explicar a diminuição significativa da pressão sanguínea após ablação bilateral do CSN.

Também, as concentrações plasmáticas de NO foram quantificadas. O NO é um potente vasodilatador que pode ser encontrado no organismo sob 3 formas (NO endotelial; NO induzível - associado à inflamação e NO neuronal). Um estudo realizado em humanos (Maejima et al., 2001), dava indicação de um aumento dos níveis de NO em diabéticos, sendo este aumento ainda mais acentuado em diabéticos hipertensos. Mais uma vez, como seria de esperar tendo em conta o trabalho de Sacramento et al., 2017, as concentrações de NO encontravam-se aumentadas no modelo sujeito a dieta HF. Corroborando novamente esse estudo, verificou-se no presente estudo, que a ablação bilateral do CSN diminui significativamente as concentrações de NO plasmático nos animais obesos.

Como já referido anteriormente, a obesidade está intimamente ligada com a exacerbação da inflamação. As melhorias nos parâmetros hemodinâmicos, quer a diminuição da pressão arterial para valores controlo quer a diminuição da concentração de NO plasmático, podem talvez ser explicados

por uma diminuição da inflamação nos animais obesos aquando do corte do CSN ou através do impedimento da sobreactivação do CB e consequente depressão da actividade do SNS. Porém, esta hipótese teria de ser testada, por exemplo através da realização de Western blots para quantificação da expressão de NO induzível e/ou adipocinas ou ainda, pela realização de kits de quantificação dos seus valores plasmáticos.

6. CONCLUSÃO

A prevalência de doenças metabólicas, nomeadamente da obesidade aumenta dramaticamente a cada ano. Assim sendo, é urgente investigar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta perturbação e identificar estratégias de tratamento que possibilitem o controlo desta epidemia mundial.

Tendo em conta os resultados apresentados, podemos sugerir que o corpo carotídeo parece ter um papel no desenvolvimento da obesidade, já que a ressecção crónica do nervo do seio carotídeo diminui o peso corporal, a massa gorda corporal e o fígado gordo em animais submetidos a uma dieta rica em lípidos. Para além disso observámos que a modulação da actividade do corpo carotídeo possibilita uma melhoria das condições patológicas associadas à obesidade, tais como a reversão da insulino-resistência, melhoria da tolerância à glucose e também uma normalização da pressão arterial. Posto isto, podemos postular que a modulação da actividade do CB poderá ser alvo terapêutico para a obesidade e as suas comorbilidades.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como propósito a realização do trabalho experimental referente ao 2º ano do Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. No entanto, dado que um ano é um período de tempo curto para a aprendizagem e optimização de técnicas e obtenção de resultados, ficam por obter alguns resultados pretendidos aquando a idealização do projecto, para compreender melhor o papel da modulação da actividade do CB na homeostasia energética, tais como:

- Estudo das vias de sinalização da insulina nos tecidos sensíveis à insulina através de Western-Blots, utilizando amostras de fígado, músculo-esquelético, BAT e depósitos de gordura (visceral, perirenal, genital e subcutânea) dos animais em estudo, para quantificação de receptor de insulina e GLUTs (GLUT 2 no fígado; GLUT 4 nos outros tecidos referidos);

- Avaliação da quantidade de mitocôndrias existentes no BAT dos animais em estudo, utilizando o *MitoTracker*;

- Avaliação do papel do BAT e a sua actividade nos animais com deservação do CSN recorrendo a Western-Blot/ imunohistoquímica para quantificação de UCP1 no BAT;

- Avaliação do efeito da deservação do CSN na modulação do SNS e, consequentemente, no fenómeno de “*Browning*” através de registos electrofisiológicos da actividade dos nervos simpáticos que enervam o BAT e ainda, avaliação da expressão de receptores adrenérgicos;

- Avaliação do perfil lipídico, quantificação feita em amostras de plasma em ensaios colorimétricos (RANDOX);

- Avaliação da concentração de catecolaminas existentes na urina colhida aquando a colocação dos animais em gaiolas metabólicas recorrendo a técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- Avaliação da concentração do citocromo C oxidase através de kits;

- Avaliação da captação da glucose marcada radioactivamente em todos os tecidos de interesse através da realização de IVGTT;

- Avaliação de biomarcadores inflamatórios, nomeadamente: NO induzível, adipocinas (como proteína C reactiva ou antioxidantes totais através de Western-Blots e/ou Kits.

8. REFERÊNCIAS

- Akiyama, T.; Tachibana, I.; Shirohara, H.; Watanabe, N.; Otsuki, M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Research and Clinical Practice* **1996**, 31 (1–3), 27–35.
- Alexandre, B.; Santos Almeida, P. Hiperglicemia <http://www.apdp.pt/diabetes/a-pessoa-com-diabetes/hiperglicemia> (accessed Jul 14, 2017).
- Arner, P. Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005, 19 (4) 471–482.
- Bartelt, A.; Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology* **2013**, 10 (1), 24–36.
- Bergman, R. N. Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia* **2000**, 43 (7), 946–952.
- Betz, M. J.; Enerbäck, S. Human brown adipose tissue: What we have learned so far. *Diabetes* **2015**, 64 (7), 2352–2360.
- Boden, G.; Shulman, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European journal of clinical investigation* **2002**, 32 (3), 14–23.
- Bonet, M. L.; Oliver, P.; Palou, A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2013**, 1831 (5), 969–985.
- Cannon, B.; Nedergaard, J. A. N. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **2004**, 277–359.
- Care, D. 7 . Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes. *American Diabetes Association* **2017**, 40 (1), 57–63.
- Chaar, L. J.; Coelho, A.; Silva, N. M.; Festuccia, W. L.; Antunes, V. R. High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. *Physiological Reports* **2016**, 4 (11), e12811.
- Chua, S. C.; Chung, W. K.; Wu-Peng, X. S.; Zhang, Y.; Liu, S. M.; Tartaglia, L.; Leibel, R. L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* **1996**, 271 (5251), 994–996.

- Chung, S.; Park, C. W.; Shin, S. J.; Lim, J. H.; Chung, H. W.; Youn, D. Y.; Kim, H. W.; Kim, B. S.; Lee, J. H.; Kim, G. H.; et al. Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2010**, 25 (2), 389–399.
- Conde, S. V.; Nunes da Silva, T.; Gonzalez, C.; Mota Carmo, M.; Monteiro, E. C.; Guarino, M. P. Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *British Journal of Nutrition* **2012**, 107 (1), 86–95.
- Conde, S. V.; Sacramento, J. F.; Guarino, M. P.; Gonzalez, C.; Obeso, A.; Diogo, L. N.; Monteiro, E. C.; Ribeiro, M. J. Carotid body, insulin and metabolic diseases: Unravelling the links. *Frontiers in Physiology* **2014**, 5 (5), 1–14.
- Considine, R. V.; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; McKee, L. J.; Bauer, T. L.; et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* **1996**, 334 (5), 292–295.
- Cowley, A. W.; Liard, J. F.; Guyton, A. C. Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs. *Circulation Research* **1973**, 32 (5), 564–576.
- Cusi, K.; Maezono, K.; Osman, A.; Pendergrass, M.; Patti, M. E.; Pratipanawatr, T.; DeFronzo, R. A.; Kahn, C. R.; Mandarino, L. J. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *Journal of Clinical Investigation* **2000**, 105 (3), 311–320.
- DeFronzo, R. a. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America* **2004**, 88 (4), 787–835.
- DeFronzo, R. A.; Bonadonna, R. C.; Ferrannini, E. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992, 15 (3), 318–368.
- Delarue, J.; Magnan, C. Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **2007**, 10 (2), 142–148.
- Desroches, S. The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **2007**, 32 (1), 23–32.
- Dyck, D. J. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* **2009**, 34 (3), 396–402.
- Figlewicz, D. P.; Benoit, S. C. Insulin , leptin , and food reward. **2009**, 296, 9–19.

- Fisher, F. F.; Kleiner, S.; Douris, N.; Fox, E. C.; Mepani, R. J.; Verdeguer, F.; Wu, J.; Kharitonov, A.; Flier, J. S.; Maratos-Flier, E.; et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes and Development* **2012**, 26 (3), 271–281.
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **1957**, 226 (1), 497–509.
- Forcheron, F.; Abdallah, P.; Basset, A.; del Carmine, P.; Haffar, G.; Beylot, M. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity* **2009**, 17 (7), 1381–1389.
- Francischetti, E. A.; Genelhu, V. A. Obesity-hypertension: An ongoing pandemic. *International Journal of Clinical Practice* 2007, 61 (2) 269–280.
- Friedman, J. M.; Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **1998**, 395 (6704) 763–770.
- Galic, S.; Oakhill, J. S.; Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2009**, 316 (2), 129–139.
- Gao, M.; Ma, Y.; Liu, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS ONE* **2015**, 10 (3), 1–15.
- Gerich, J. Physiology of glucosis homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **2000**, 2 (6), 345–350.
- Gonzalez-Martin, M. C.; Vega-Agapito, V.; Prieto-Lloret, J.; Agapito, M. T.; Castaneda, J.; Gonzalez, C. Effects of intermittent hypoxia on blood gases plasma catecholamine and blood pressure. *Adv Exp Med Biol* **2009**, 648, 319–328.
- González, C.; Almaraz, L.; Obeso, A.; Rigual, R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends in Neurosciences*. 1992, 146–153.
- González, C.; López-López, J.; Obeso, A.; Pérez-García, M. T.; Rocher, A. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. *Respiration Physiology* **1995**, 102 (2–3), 137–147.
- Goossens, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology and Behavior* **2008**, 94 (2), 206–218.
- Grundy, S. M.; Brewer, H. B.; Cleeman, J. I.; Smith, S. C.; Lenfant, C.; Participants, C. Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. **2004**, 109, 433–438.

- Grundy, S. M.; Cleeman, J. I.; Daniels, S. R.; Donato, K. A.; Eckel, R. H.; Franklin, B. A.; Gordon, D. J.; Krauss, R. M.; Savage, P. J.; Smith, S. C.; Scientific Statement. *American Heart Association* **2005**, 112, 2735–2752.
- Guarino, M.P., Ribeiro, M. J., Sacramento, J.F., Conde, S.V. Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat: effect on skeletal muscle Glut 4 transporters and AMPK activity. *Age* **2013**, 35 (5), 1755-1765.
- Guertin, L. Adipocytes <https://www.umassmed.edu/guertinlab/research/adipocytes/> (accessed Mai 26, 2017).
- Guyton, A.; Hall, J. *Textbook of Medical Physiology*, 11ª Edição.; Elsevier Inc.: Filadélfia, 2006.
- Halaas, J.; Gajiwala, K.; Maffei, M.; Cohen, S.; Chait, B.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.; Burley, S.; Friedman, J. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **1995**, 269 (5223), 543–546.
- Harms, M.; Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* **2013**, 19 (10), 1252–1263.
- Irigoyen, M. C.; Moreira, E. D.; Ida, F.; Pires, M.; Cestari, I. A.; Krieger, E. M. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension* **1995**, 26 (6), 1111–1116.
- Iturriaga, R.; Alcayaga, J. Neurotransmission in the carotid body : transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Research Reviews* **2004**, 47 (3), 46–53.
- Iwashita, S.; Tanida, M.; Suzuki, M. Decreased skeletal muscle insulin receptors in high-fat diet-related hypertensive rats. *Nutrition Research* **2002**, 22 (9), 1049–1053.
- James, P. T. Obesity: The worldwide epidemic. *Clinics in Dermatology* **2004**, 22 (4), 276–280.
- Kamgang, R.; Mboumi, R. Y.; Mengue N'dillé, G. P. R.; Yonkeu, J. N. Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**, 69 (3), 224–230.
- Katagiri, H.; Yamada, T.; Oka, Y. Adiposity and cardiovascular disorders: Disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. *Circulation Research* **2007**, 101 (1), 27–39.
- Kershaw, E. E.; Flier, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Journal Clinical Endocrinol Metabolism* **2004**, 89 (6), 2548–2556.

- Kinzig, K. P.; Honors, M. A.; Hargrave, S. L. Insulin sensitivity and glucose tolerance are altered by maintenance on a ketogenic diet. *Endocrinology* **2010**, 151 (7), 3105–3114.
- Koyama, Y.; Coker, R. H.; Stone, E. E.; Lacy, D. B.; Jabbour, K.; Williams, P. E.; Wasserman, D. H. Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* **2000**, 49 (9), 1434–1442.
- Kumar, P.; Bin-Jaliah, I. Adequate stimuli of the carotid body: More than an oxygen sensor? *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2007**, 157 (1), 12–21.
- Kusminski, C. M.; Bickel, P. E.; Scherer, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Publishing Group* **2016**, 15 (9), 639–660.
- Lizcano, F.; Vargas, D. Biology of Beige Adipocyte and Possible Therapy for Type 2 Diabetes and Obesity. *International Journal of Endocrinology* **2016**, 2016.
- Lohmeier, T. E.; Iliescu, R. The Baroreflex as a Long-Term Controller of Arterial Pressure. *Physiology* **2015**, 30 (2), 148–158.
- Lohmeier, T. E.; Warren, S.; Cunningham, J. T. Sustained activation of the central baroreceptor pathway in obesity hypertension. *Hypertension* **2003**, 42 (1), 96–102.
- López-Barneo, J. Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Current Opinion in Neurobiology* **2003**, 13 (4), 493–499.
- Maejima, K.; Nakano, S.; Himeno, M.; Tsuda, S.; Makiishi, H.; Ito, T.; Nakagawa, A.; Kigoshi, T.; Ishibashi, T.; Nishio, M.; et al. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. *Journal of Diabetes and its Complications* **2001**, 15 (3), 135–143.
- Monzillo, L. U.; Hamdy, O. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutrition Reviews*. **2003**, 61 (12), 397–412.
- Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 219 (3), 713–725.
- Nascimento, A. F.; M., S. M.; Leopoldo, A. S.; Lima-Leopoldo, A. P.; Luvizotto, A. A. M.; Nogueira, C. R.; C., C. A. A Hypercaloric Pellet-Diet Cycle Induces Obesity and Co-Morbidities in Wistar Rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism* **2008**, 52 (6), 968–974.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.*; 2013.
- Norman, R. A.; Coleman, T. G.; Dent, A. C. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension* **1981**, 3 (1), 119–125.

- Olea, E. Dieta hipercalórica e hipoxia intermitente crónica como modelos de obesidad y apnea obstructiva del sueño. Significado de la leptina en el control respiratorio, FACULTAD DE MEDICINA, Universidad de Valladolid, 2016.
- Olea, E.; Agapito, M. T.; Gallego-Martin, T.; Rocher, A.; Gomez-Nino, A.; Obeso, A.; Gonzalez, C.; Yubero, S. Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *Journal of Applied Physiology* **2014**, 117 (7), 706–719.
- Oliveira, S. A.; Abcdefg, J.; Ad, M. D. P.; Bde, P. F. M.; B, A. F. N.; Bdef, M. P. O.; Bde, K. O.; Ac, C. R. P.; Adefg, A. C. C. Differential nutritional , endocrine , and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Medical Science Monitor* **2010**, 16 (7), 208–217.
- Paton, J. F. R.; Sobotka, P. A.; Fudim, M.; Engelman, Z. J.; Hart, E. C. J.; McBryde, F. D.; Abdala, A. P.; Marina, N.; Gourine, A. V.; Lobo, M.; et al. Response to role of the carotid body in obesity-related sympathoactivation. *Hypertension* **2013**, 61 (6), 2012–2013.
- Patschan, S.; Scholze, J. Obesity-related hypertension. *Cardiology Review*. 2007, 32–35.
- Poretsky, L. *Principles of diabetes mellitus*; 2010.
- Qian, S.; Huang, H.; Tang, Q. Brown and beige fat : the metabolic function , induction , and therapeutic potential. *Frontiers in Medicine* **2014**, 9 (2), 162-172.
- Rahmouni, K.; Correia, M. L. G.; Haynes, W. G.; Mark, A. L. Obesity-associated hypertension: New insights into mechanisms. *Hypertension*. 2005, 9–14.
- Rena, G.; Hardie, D. G.; Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017, 1–9.
- Ribeiro, M. J.; Sacramento, J. F.; Gonzalez, C.; Guarino, M. P.; Monteiro, E. C.; Conde, S. V. Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes* **2013**, 62 (8), 2905–2916.
- Ríos, M.; Fuentes, J. *Type 2 diabetes mellitus: The molecular and genetic basis of type 2 diabetes mellitus*, 1ª Edição.; Espanha, 2009.
- Sacramento, J. F.; Ribeiro, M. J.; Rodrigues, T.; Olea, E.; Melo, B. F.; Guarino, M. P.; Fonseca-Pinto, R.; Ferreira, C. R.; Coelho, J.; Obeso, A.; et al. Functional abolition of carotid body activity restores insulin action and glucose homeostasis in rats: key roles for visceral adipose tissue and the liver. *Diabetologia* **2017**, 60 (1), 158–168.

- Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **2001**, 414 (6865), 799–806.
- Shrayyef, M. Z.; Gerich, J. E. Normal glucose homeostasis. Em *Principles of Diabetes Mellitus*; 2010; 19–35.
- Sidossis, L.; Kajimura, S. Brown and beige fat in humans : thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, 125 (2), 478–486.
- Sreenan, S.; Keck, S.; Fuller, T.; Cockburn, B.; Burant, C. F. Effects of troglitazone on substrate storage and utilization in insulin-resistant rats. *The American journal of physiology* **1999**, 276 (6), 1119–1129.
- Stetka, B. Obesity: The Shocking Numbers and New Treatments. *Medscape Nurses* **2015**.
- Sun, L.; Zeng, X.; Yan, C.; Sun, X.; Gong, X.; Rao, Y.; Yan, N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1–4. *Nature* **2012**, 490 (7420), 361–366.
- Thyagarajan, B.; Foster, M. T. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **2017**, 1–13.
- Torres-Villalobos, G.; Hamdan-Pérez, N.; Díaz-Villaseñor, A.; Tovar, A. R.; Torre-Villalvazo, I.; Ordaz-Nava, G.; Morán-Ramos, S.; Noriega, L. G.; Martínez-Benítez, B.; López-Garibay, A.; et al. Autologous subcutaneous adipose tissue transplants improve adipose tissue metabolism and reduce insulin resistance and fatty liver in diet-induced obesity rats. *Physiological Reports* **2016**, 4 (17), e12909.
- Trayhurn, P.; Beattie, J. H. Physiological role of adipose tissue : white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society* **2001**, 60, 329–339.
- Verwaerde, P.; Galinier, M.; Rougé, P.; Massabuau, P.; Galitzky, J.; Sénard, J.; Berlan, M.; Montastruc, J. Experimental hypertension induced by hypercaloric diet. *Arch Mal Coeur Vaiss* **1996**, 89 (8), 1019–1023.
- Watson, R. T.; Pessin, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent progress in hormone research* **2001**, 56, 175–193.
- Wehrwein, E. A.; Basu, R.; Basu, A.; Curry, T. B.; Rizza, R. A.; Joyner, M. J. Hyperoxia blunts counterregulation during hypoglycaemia in humans: possible role for the carotid bodies? *The Journal of Physiology* **2010**, 588 (22), 4593–4601.
- White, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **2002**, 283 (3), E413-22.

- Wilson, P. W. F.; Agostino, R. B. D.; Parise, H.; Sullivan, L.; Meigs, J. B. Metabolic Syndrome as a Precursor of Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* **2005**, 3066–3073.
- Ye, J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 405–408.
- Ye, J.; Gimble, J. M. Regulation of Stem Cell Differentiation in Adipose Tissue by Chronic Inflammation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **2011**, 38 (12), 872–878.
- Zafrir, B. Brown adipose tissue: Research milestones of a potential player in human energy balance and obesity. *Hormone and Metabolic Research* **2013**, 45 (11), 774–785.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **1994**, 372 (6505), 425–432.
- Zhao, F.-Q.; Keating, a F. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of dairy science* **2007**, 90, E76-86.